

Aus dem Bereich
Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. med. Danilo Fliser)
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Miniaturisierung einer Methode zur Abschätzung der
Nierenfunktion (GFR und ERPF) an gesunden und
5/6-nephrektomierten Mäusen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von Mirjam Wagner

geb. am 20.04.1986 in Trier

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung und Summary	6
1.1 Zusammenfassung	6
1.2 Summary	8
2 Einleitung.....	10
2.1 Die chronische Niereninsuffizienz (CNI).....	10
2.1.1 Epidemiologie	10
2.1.2 Definition	11
2.2 Nephrologische Parameter	12
2.2.1 Aufbau der Niere und Grundlage der Nierenfunktion.....	12
2.2.2 Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	13
2.2.3 FITC-markiertes Inulin und andere Marker zur Messung der GFR	14
2.2.4 Der renale Plasmafluss (RPF)	17
2.2.5 4-para-Aminohippursäure (PAH) und andere Marker zur Messung des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF)	17
2.3 Bisherige Methoden und Probleme der Clearance-Bestimmung am Mausmodell	19
2.4 Fragestellung	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Chemikalien	22
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.3 Materialien	24
3.1.4 Geräte	26
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Biometrische Planung / Versuchsaufbau	27
3.2.2 Tiere.....	29
3.2.3 FITC-Inulin-Proben	34
3.2.4 PAH-Proben	35
3.2.5 Berechnung der GFR und Darstellung der PAH-Ergebnisse	37
3.2.6 Statistik	39
4 Ergebnisse	41

4.1	Überlebensrate der Versuchstiere und Auswertbarkeit der Ergebnisse von GFR-Messung und PAH-Bestimmung.....	41
4.2	Vergleich der GFR-Messung vor (Gruppe A) und nach (Gruppe B) PAH-Injektion	42
4.3	Vergleich der PAH-Bestimmung vor (Gruppe B) und nach (Gruppe A) GFR-Messung	43
4.4	Gegenüberstellung der Einzelmessungen von GFR und PAH und der Doppelmessungen (PAH+GFR).....	44
4.5	Beobachtung von GFR- und PAH-Bestimmung der 5/6-nephrektomierten Mäuse im Verlauf	45
4.5.1	Verlauf der Nierenfunktion vor und nach 5/6-Nx anhand der GFR.....	46
4.5.2	Gegenüberstellung der PAH-Ausscheidungskinetik im Verlauf vor und nach 5/6-Nx	47
5	Diskussion	49
5.1	GFR-Ergebnisse der nierengesunden Mäuse.....	49
5.2	GFR-Ergebnisse der 5/6-nephrektomierten Mäuse.....	51
5.3	Ergebnisse der PAH-Bestimmung und kombinierten Messung von GFR und PAH-Plasma-Clearance.....	53
6.	Literaturverzeichnis.....	55
7.	Tabellenverzeichnis.....	60
8.	Abbildungsverzeichnis.....	61
9.	Danksagung.....	62
10.	Anlage I. Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4.....	63

Abkürzungsverzeichnis

ANV	Akutes Nierenversagen
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CNV	Chronisches Nierenversagen
DACA	4-Dimethyl-aminocinnam-aldehyd
ERPF	Effektiver renaler Plasmafluss
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (<i>engl. high-performance liquid chromatography</i>)
PAH	4-Para-aminohippursäure
RPF	Renaler Plasmafluss
TCA	Trichloressigsäure
5/6-Nx	5/6-Nephrektomie

1 Zusammenfassung und Summary

1.1 Zusammenfassung

Die Nierenfunktionsmessung ist ein wichtiges Werkzeug der Nephrologie, insbesondere zur Diagnose eines Krankheitsbildes, dessen Bedeutung aufgrund weltweit steigender Inzidenz und Prävalenz zunimmt: die Niereninsuffizienz. Die frühzeitige Erkennung ist wichtig, um prognostische Aussagen zum individuellen Insuffizienzverlauf treffen zu können, diesen sogar zu verbessern und zusätzlich auch gesamtwirtschaftliche Kosten zu senken. Methoden zur Nierenfunktionsmessung werden üblicherweise am Mausmodell etabliert, das aber an Grenzen stößt, beispielsweise in der Auswahl und Zufuhr des Markers, sowie in der Blutentnahme und Urinsammlung. Die Untersuchungen dieses Forschungsprojektes sollen zur Vereinfachung der Nierenfunktionsmessung am Mausmodell beitragen. Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) stellt derzeit den wichtigsten Parameter zur Beschreibung der Nierenfunktion dar. Des Weiteren wird an 4-para-Aminohippursäure (PAH) als Marker zur Beschreibung des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF) geforscht. In der vorliegenden Dissertation wurde eine Methode zur GFR-Messung mittels FITC-Inulin-Clearance und PAH-Bestimmung per Single-Shot-Technik unter Verwendung von minimalen Blutmengen etabliert. Als Fragestellung wurden die Messungen jeweils einzeln, nacheinander und gemeinsam vorgenommen und deren Durchführbarkeit und Kombinierbarkeit untersucht. Anschließend wurde die kombinierte Messung erneut an 5/6-nephrektomierten Mäusen durchgeführt und der Verlauf von GFR und PAH-Elimination nach Induktion des Nierenschadens beobachtet.

Für die Versuchsreihen wurden 129/Sv-Mäuse verwendet, denen mittels Single-Shot-Methode FITC-Inulin und/oder PAH in die Schwanzvene injiziert und nach einem festgelegten Zeitschema über 75 min jeweils 10 µl Blut entnommen wurde. Nach der Probenverarbeitung wurde aus der Fluoreszenz der FITC-Inulin-Messung die GFR berechnet. Die Eliminationskinetik der PAH wurde in Abhängigkeit zum Messtermin grafisch dargestellt. Im weiterführenden Versuch wurde die GFR- und PAH-Bestimmung analog der beschriebenen Methode als Kombinationsinjektion vor 5/6-

Nephrektomie und eine, fünf und neun Wochen danach beobachtet. In den gesamten Versuchsreihen wurde auf Urinmessungen verzichtet.

Es konnten im miniaturisierten Versuchsaufbau repräsentable Ergebnisse - auch bei gleichzeitiger Injektion von FITC-Inulin und PAH - und eine problemlose Wiederholbarkeit erzielt werden. Auch bei den 5/6-nephrektomierten Mäusen konnte die GFR im Verlauf ungehindert in der Doppelmessung verfolgt werden. Es zeigte sich zuerst ein Abfall, dann eine Regenerationstendenz im GFR-Verlauf. Bezüglich der PAH-Ergebnisse konnte lediglich die kombinierbare Anwendung nachgewiesen werden. Eine Auswertung der Ergebnisse zum ERPF analog zu denen der GFR ist derzeit noch nicht bekannt und bietet einen Ansatz für weiterführende Forschung.

Ein in dieser Arbeit nicht ausgeführter Punkt für tiefergehende Forschung sind Narkosezeit und -tiefe als mögliche Einflussfaktoren der Nierenfunktion. Weiterhin wäre in Folgeuntersuchungen eine längere Beobachtung der Nierenfunktion nach 5/6-Nephrektomie und eine histologische Aufarbeitung zur Beurteilung des Schadensausmaßes und der Regeneration ein interessanter Ansatz.

Insgesamt bestätigt die vorgelegte Dissertation die Miniaturisierbarkeit der Methode zur GFR-Messung und PAH-Bestimmung. Die Wiederholbarkeit und Verträglichkeit im Mausmodell bekräftigt weitere Forschung diesbezüglich. Durch den Nachweis der gemeinsamen Messbarkeit von GFR und PAH bietet sie weiterhin Anlass zur Beobachtung von GFR und RPF im selben Versuchsaufbau. Im Vergleich zu anderer aktueller Forschung wie der transkutanen Messung der GFR in vivo zeigt sie im Mausmodell mit ihrer minimalen Invasivität eine vergleichbare Verträglichkeit bei geringerem Aufwand.

1.2 Summary

Miniaturization of a method for determining kidney function (GFR and ERPF) using healthy and 5/6-nephrectomized mice

The measurement of renal function is an important tool in nephrology, especially for diagnosis of a clinical picture that gains in importance as its worldwide incidence and prevalence increase: kidney disease. Early recognition is important to be able to predict an individual's course of disease, to improve it and additionally to decrease macroeconomic cost. Methods for measuring renal function are usually established on mice, although being limited in choice and application of the marker and in blood withdrawal and urine collection. The goal of this research project is to simplify the measurement of renal function on mice. The measurement of glomerular filtration rate (GFR) is currently the most important parameter for describing kidney function. Furthermore, there's research being done on the use of 4-para-aminohippuric acid (PAH) as a marker for describing the effective renal plasma flow (ERPF). In this dissertation, a method is established to measure GFR using FITC-inulin clearance and PAH while applying single-shot technique and minimal blood samples. Measurements have been done alone, sequentially and combined and then analyzed in terms of viability and compatibility. The combined measurement was then rerun with 5/6-nephrectomized mice to observe the progression of GFR and PAH elimination after induction of kidney dysfunction.

For the series of tests, FITC-inulin and/or PAH was injected into the tail vein using the single-shot technique. 10 µl blood samples were then taken over 75 min using a fixed time schema. After processing the samples, the fluorescence of FITC-inulin was used to determine the GFR. Additionally, a chart of the elimination kinetics of PAH was created. In a further series of tests, GFR and PAH were determined using the same method, but with combined injections prior to 5/6-nephrectomy, and observed one, five and nine weeks after. In the complete series, no analysis of urine was done.

In the miniaturized test set-up, representable results have been found – even with combined injection of FITC-inulin and PAH – and repeatability could be achieved without problems. Even on 5/6-nephrectomized mice the GFR could be smoothly observed in combined measurements. The GFR first notably decreased, but then a regeneration tendency became visible. Concerning PAH results only the compatibility

with FITC-inulin could be established. An analysis of the results of the ERPF along the lines of the GFR results is currently not known and offers an incentive for further research.

A question not examined in this project is the influence of anesthesia length and depth on kidney function. Another interesting approach is a longer observation of kidney function after 5/6-nephrectomy and a histological analysis for evaluating the impact of kidney damage and its regeneration.

Overall, this dissertation confirms that the method for GFR and PAH measurement can be miniaturized. The repeatability and tolerance on mice reinforces further research in this area. By proving that combined measurement of GFR and PAH is possible, it provides reason for further observation of GFR and ERPF in the same experimental set-up. In comparison to other current research, like the transcutaneous measurement of GFR in conscious mice, it shows a comparable compatibility with minimal invasiveness and less effort.

2 Einleitung

2.1 Die chronische Niereninsuffizienz (CNI)

2.1.1 Epidemiologie

Chronische Nierenerkrankungen stellen weltweit eine immer größer werdende Problematik im Gesundheitswesen dar. In der NHANES-Studie (National Health and Nutrition Examination Surveys), einer national repräsentativen Querschnittsstudie zur Prävalenz und Inzidenz des chronischen Nierenversagens in den USA von 2007, wurde ein deutlicher Anstieg der beiden epidemiologischen Maßzahlen von 1988-1994 bis 1999-2004 verzeichnet (Coresh et al., 2007). Die Prävalenz aller Stadien der CNI (1-4) (siehe 2.1.2) zusammen stieg der Studie nach um 3,1%.

Die Metaanalyse von Meguid El Nahas und Bello (2005) mit einem Datenerhebungszeitraum von 2000-2003 ermittelte eine Inzidenz des terminalen Nierenversagens in den USA von 336/1000000 Einwohner/Jahr und in Europa von 135/1000000 Einwohner/Jahr. Auch im Schwellenland Indien ließ sich laut der Studie eine Inzidenz von 34-240/1000000 Einwohner/Jahr verzeichnen.

Dem Jahresbericht der QuaSi-Niere (Qualitätssicherung in der Nierenersatztherapie) der Bundesverbände der Krankenkassen und der Leistungserbringer der Nierenersatztherapie zufolge lag allein in Deutschland im Jahr 2005 eine Prävalenz von 769 Dialysepatienten und 288 Nierentransplantierten pro Millionen Einwohner vor. Seit 1995 ist demnach die Zahl der über 62-jährigen Dialysepatienten um mehr als 50% und die der Nierentransplantierten um mehr als 70% gestiegen.

Anhand der oben genannten Daten wird die andauernde Brisanz dieser Thematik deutlich. Aus der kontinuierlich steigenden Inzidenz und Prävalenz der CNI resultieren nicht nur individuell gesundheitliche, sondern auch immense gesamtwirtschaftliche Folgen und Kosten. Daher gilt es Modelle zur Nierenfunktionsmessung zu präzisieren, um frühzeitig eine Niereninsuffizienz erkennen oder prognostische Aussagen über eine fortschreitende Niereninsuffizienz treffen zu können. Somit können frühzeitig therapeutische Maßnahmen ergriffen, gesamtwirtschaftliche Kosten reduziert und Insuffizienzverläufe positiv beeinflusst oder sogar vermieden werden. Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF) haben als prognostische

Parameter der Nierenfunktion zurzeit die wichtigste klinische Bedeutung zur Verlaufskontrolle inne (siehe 2.2.2 und 2.2.4) und wurden daher in dieser Dissertation untersucht.

2.1.2 Definition

Nach der weltweit anerkannten Definition der CNI der National Kidney Foundation (NKF) aus der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) von 2002 kann man die CNI des Menschen anhand der Proteinurie und der GFR (siehe 2.2.2) in fünf Schweregrade einteilen (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz (CNI) der NKF

Stadium	Beschreibung	GFR [ml/min/1,73m²]
1	Nierenschaden mit normaler oder erhöhter GFR	> 90
2	Nierenschaden mit leicht erniedrigter GFR	60-89
3	Moderat erniedrigte GFR	30-59
4	Schwer erniedrigte GFR	15-29
5	Nierenversagen	>15

Das chronische Nierenversagen (CNV) ist ein langsam fortschreitender destruktiver Prozess, der zu einem irreversiblen Verlust der Nierenfunktion führt. Dieser Prozess ist unabhängig davon, ob die zu Grunde liegende Ursache der Nierenschädigung noch vorliegt oder bereits behandelt wurde (Mandal et al., 2005).

Ein CNV kann auch aus einem vorangegangenen akuten Nierenversagen (ANV) resultieren. Bei dem ANV kommt es durch ein abrupt einsetzendes destruktives Ereignis zu einem Nierenfunktionsverlust, der prinzipiell reversibel ist. Das Risiko ein CNV zu entwickeln, ist für Patienten, die in der Vorgeschichte ein ANV mit Dialysebehandlung hatten, allerdings deutlich erhöht (Lo et al., 2009).

In der vorliegenden Dissertation wurde die Nierenfunktionsmessung am Mausmodell gewählt. Das Mausmodell ist bis heute ein häufig verwendetes und etabliertes

Tiermodell zur Erforschung der Nierenfunktion (Schock-Kusch et al., 2013; Rieg, 2013; Sällström et al., 2013; Qi et al., 2004; Sturgeon et al., 1998).

Zur Untersuchung der geschädigten Niere wurde in den fortgeschrittenen Versuchsreihen das Nierenschädigungsmodell der 5/6-Nephrektomie (5/6-Nx) (Qi et al., 2004; Gava et al. 2012; Fleck et al., 1999) betrachtet. Es wird hiermit zwar ein irreversibler, abrupt einsetzender Schaden gesetzt, weshalb die 5/6-Nx primär als eine Form des ANV einzuordnen ist. Das ANV ist im Vergleich zum CNV im Mausversuch deutlich einfacher, gezielter und schneller zu setzen und wurde dem schrittweise induzieren eines CNV (Leelahavanichkul et al., 2010) vorgezogen. Dennoch bildet dieser akute Nierenfunktionsverlust die Grundlage zur Entwicklung eines CNV, weshalb die 5/6-Nx im zeitlichen Verlauf als Niereninsuffizienzmodell beider Versagen zu interpretieren ist (Gava et al., 2012).

2.2 Nephrologische Parameter

2.2.1 Aufbau der Niere und Grundlage der Nierenfunktion

Makroskopisch lässt sich die Niere in Kortex (Rinde) und Medulla (Mark) unterteilen und wird von einer Kapsel umgeben. Im Nierenhilus treten Arteria renalis, Vena renalis, versorgende Nerven sowie Lymphgefäße und Ureter in die Niere ein bzw. aus. Jede Niere wird von meist einer Arteria renalis mit Blut versorgt, die sich bereits vor Eintritt in den Nierenhilus in einen vorderen und hinteren Hauptstamm (Ramus anterior et posterior) teilt. Diese verzweigen sich weiter zu Segmentarterien und versorgen die unterschiedlichen Nierenareale.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Ein Nephron besteht aus einem Glomerulus, dem Ort der Filtration des Primärharns, und einem ableitenden Tubulussystem, in dem alle Resorptions- und Sekretionsprozesse stattfinden (siehe Abbildung 1).

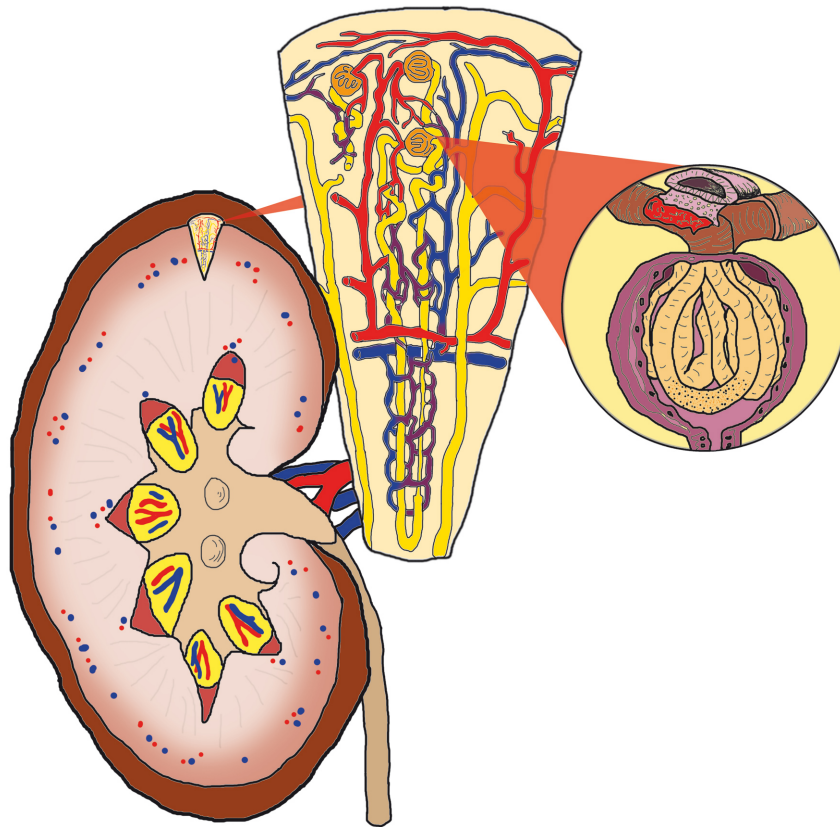


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Nierenaufbaus. Einteilung in Mark und Rinde, sowie Darstellung des Nephrons mit Glomerulus und Tubulussystem.

Das Prinzip der Nierenfunktion besteht darin, dass von dem durchfließenden Blut in den Glomeruli der Primärharn in die Nierentubuli abgepresst wird. Dieses Ultrafiltrat wird beim Durchlaufen des Tubulussystems mithilfe von Resorptions- und Sekretionsprozessen, die als passive Diffusion und aktive Transportmechanismen von statten gehen, zum endgültigen Urin modifiziert und ausgeschieden (Hierholzer et al., 1997).

2.2.2 Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die GFR wird anhand der Clearance eines Stoffes als die Plasmamenge in ml definiert, die pro Minute durch die Nierentätigkeit von diesem Stoff befreit wird. Die Clearance-Berechnung beruht darauf, dass das Produkt aus gereinigtem Plasmavolumen pro Zeiteinheit (V_P) und der Plasmakonzentration (K_P), dem Produkt

aus Urinvolumen pro Zeiteinheit (V_U) und Urinkonzentration (K_U) entspricht (Möller et al., 1928; Kampmann et al., 1981).

$$V_P * K_P = V_U * K_U$$

V_P = gereinigtes Plasmavolumen pro Zeiteinheit = Clearance = GFR

K_P = Konzentration des Stoffs im Blutplasma

V_U = Harnzeitvolumen

K_U = Konzentration des Stoffs im Urin

Löst man die Gleichung nach der Clearance auf, erhält man folgende Formel zur Berechnung der GFR:

$$V_P = \frac{V_U * K_U}{K_P}$$

Ein Stoff, der zur Bestimmung der GFR geeignet ist, muss demnach im Glomerulus, dem Ort der Primärharnfiltration, frei filtriert und im Tubulus-System weder rückresorbiert noch sezerniert und somit vollständig ausgeschieden werden. Die treibende Kraft der glomerulären Filtration ist der effektive Filtrationsdruck, der maßgeblich von der Nierendurchblutung beeinflusst wird.

2.2.3 FITC-markiertes Inulin und andere Marker zur Messung der GFR

Die verwendete Substanz zur Messung der GFR in der vorliegenden Dissertation ist Fluoreszin-Isothiocyanat-markiertes Inulin, kurz FITC-Inulin. Inulin ist ein Polysaccharid, das vollständig filtriert, aber weder sezerniert noch rückresorbiert wird (siehe Abbildung 2). Von Säugetieren kann Inulin nicht körpereigen hergestellt werden und muss deshalb entweder per Dauertropfinfusion oder Single-Bolus-Injektion dem Organismus zugeführt werden (Qi et al., 2004; Qi et al, 2009; Rieg et al., 2013). In den beschriebenen Versuchen wurde die letztere Methode gewählt. Die Inulin-Clearance gilt derzeit als Goldstandard zur Abschätzung der GFR (Delanaye P et al., 2011).

Der Fluoreszenzfarbstoff FITC, mit dem das Inulin markiert wird, färbt die FITC-Inulin-Lösung gelb und ist bei der Extinktionsmessung detektierbar. Medien, in denen

der Farbmarker nachweisbar ist, sind Blutplasma (Messung der Eliminationskinetik) und Urin (Messung der Exkretionsrate im 24h Sammelurin).

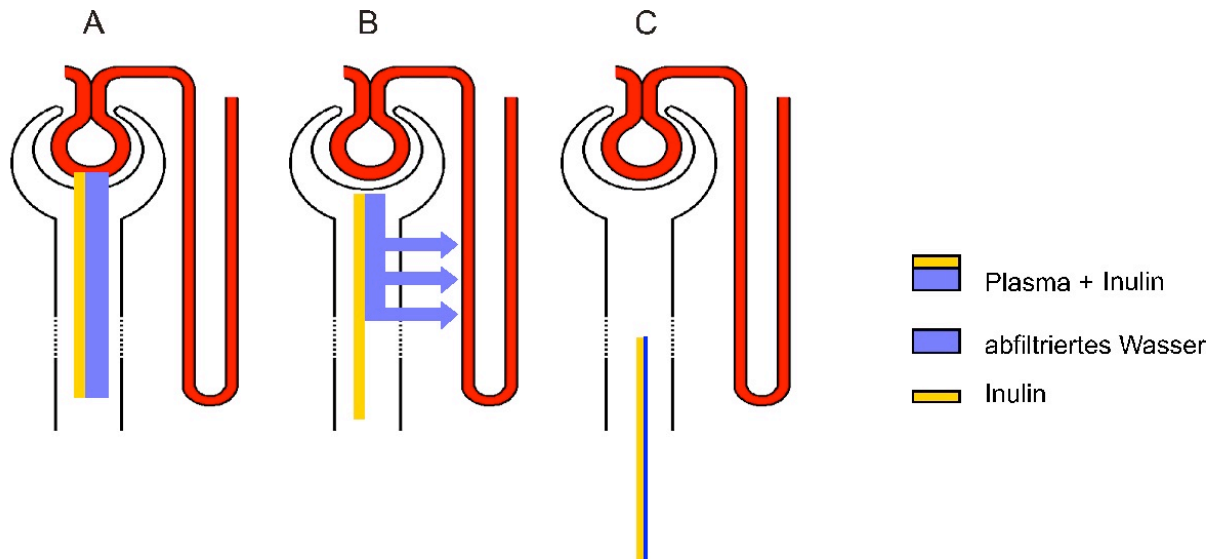


Abbildung 2: Vorgänge im Glomerulus für FITC-Inulin. Das FITC-Inulin wird im Glomerulus frei mit dem Plasmafiltrat resorbiert (A), weder rückresorbiert noch sezerniert (B) und vollständig wieder ausgeschieden (C).

In der angewandten Medizin wird zumeist die Kreatinin-Clearance zur Messung der GFR verwendet. Kreatinin hat den Vorteil, dass es körpereigen als Abbauprodukt von Kreatin im Muskel produziert wird. Allerdings ist es ein ungenauer Marker, der zu Überschätzungen der GFR führen kann, weil es gering tubulär sezerniert wird und abhängig von exogenen Faktoren wie Muskelmasse, Geschlecht, Alter, ethnischer Zugehörigkeit und bestimmten Nahrungsmitteln ist (Kampmann et al., 1981). Ein Anstieg des Kreatinins im Serum erfolgt außerdem erst nach einer 50%-igen GFR-Einschränkung. Das heißt, der Detektionsbereich für Kreatinin wird erst bei einem 50%-igen Nierenfunktionsverlust erreicht (Schmidt, 2005). Hiervor herrscht ein sogenannter „Kreatinin-blinder“ Bereich, der wahrscheinlich durch eine gesteigerte tubuläre Kreatininsekretion im Stadium 2 und 3 der CNI entsteht (Horio, 2006). Der Kreatininwert im Serum ist daher ungeeignet, um Veränderungen der Nierenfunktion frühzeitig zu erfassen. Die Kreatinin-Clearance ist deshalb nur als Screening-Methode zur Erkennung bereits entstandenen Nierenschadens geeignet.

Als Schätzwert der GFR wird in der Klinik die Kreatinin-Clearance unter Einbeziehung von Alter, Gewicht und Geschlecht mittels der Cockcroft-Gault-Formel

(Cockcroft et al., 1973) oder genauer unter Einbeziehung von Alter, Gewicht, Geschlecht und Hautfarbe in Form der MDRD-Formel (Modifikation of Diet in Renal Disease) (Levey et al., 1999) verwendet.

Der Cystein Protease Inhibitor Cystatin C ist ein neuerer und genauerer Marker als das Kreatinin (Dworkin, 2001). Cystatin C ist deutlich weniger abhängig von Alter, Muskelmasse und Geschlecht (Rule et al., 2006) und wird körpereigen konstant produziert. Außerdem gibt es keinen „Cystatin-C-blinden“ Bereich. Allerdings wird auch das Cystatin C von gewissen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe, Rauchen und Entzündung beeinflusst (Knight et al., 2004). Zudem ist die Cystatin C-Bestimmung sehr teuer und die Messmethode ist zeitaufwendiger als die Kreatininmessung. Deswegen wird die Cystatin C-Bestimmung nicht standardmäßig in allen Kliniken und Fachbereichen im Alltag eingesetzt.

Aus all diesen Gründen hat sich Inulin als zuverlässiger und preiswerter Marker für eine genaue Bestimmung der GFR in der Forschung etabliert. Es wurde in der vorliegenden Doktorarbeit in FITC-markierter Form verwendet und dessen Eliminationskinetik ausschließlich im Blut beobachtet.

2.2.4 Der renale Plasmafluss (RPF)

Der RPF wird als die Plasmamenge definiert, die pro Minute durch beide Nieren fließt. Auch hier erfolgt die Berechnung anhand der Clearance eines Stoffes, der frei filtriert, nicht resorbiert, jedoch sezerniert wird und wird mit derselben Clearance Formel dargestellt (Klinke und Silbernagl, 2003).

$$V_P = \frac{V_U * K_U}{K_P}$$

Der RPF stellt somit ein zweites Maß für die Bestimmung der exkretorischen Nierenfunktion dar, welches nicht nur die glomeruläre Filtration, sondern auch die tubuläre Sekretion mit einbezieht.

2.2.5 4-para-Aminohippursäure (PAH) und andere Marker zur Messung des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF)

Die nicht körpereigen hergestellte 4-para-Aminohippursäure, kurz PAH, eignet sich zur Bestimmung des RPF, da sie frei filtriert, nicht rückresorbiert, aber tubulär sezerniert wird (Smith 1938, Agarwal, 2002; Sällström et al., 2013) (siehe Abbildung 3). Sie kann, analog dem FITC-Inulin, per Dauertropfinfusion oder Single-Bolus-Methode, wie in den nachfolgenden Versuchen, zugeführt werden. Beim Menschen werden etwa 90% der durch die Niere fließenden PAH direkt ausgeschieden, davon 20% über die Filtration und 70% über die Sekretion (Klinke und Silbernagl, 2003). Der reelle RPF liegt also ca. 10% höher als der durch die PAH-Clearance errechnete effektive RPF. Deshalb wird die Formel des RPF mittels der PAH-Clearance mit dem Faktor 0,9 modifiziert und somit der effektiven renalen Plasmafluss (ERPF) berechnet:

$$V_P = \frac{V_U * K_U}{K_P} * 0,9$$

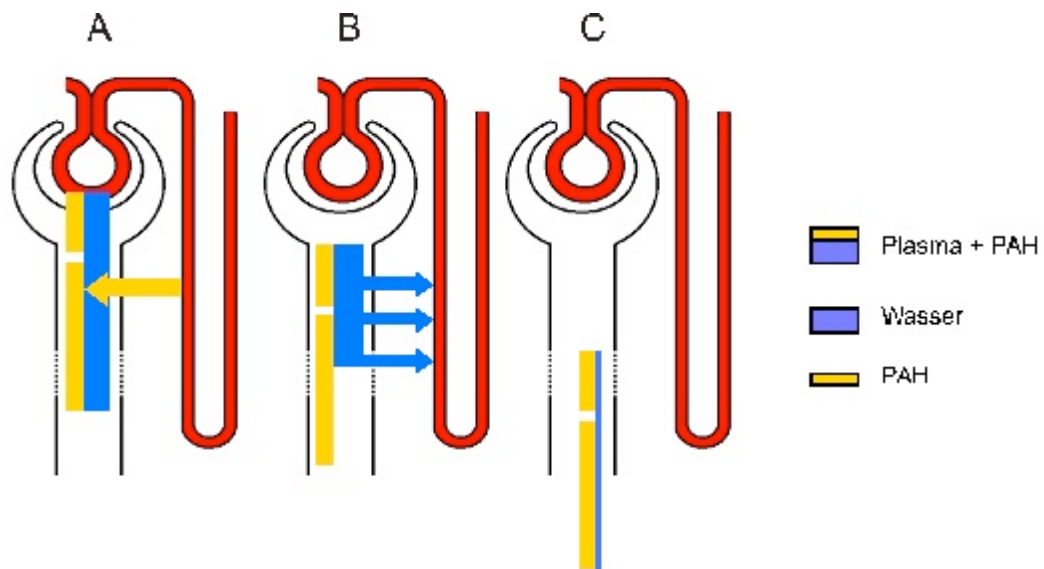


Abbildung 3: Vorgänge im Glomerulus für PAH. Das PAH wird im Glomerulus frei mit dem Plasmafiltrat resorbiert, zusätzlich sezerniert (A) und nicht rückresorbiert (B). Die filtrierte und sezernierte PAH wird fast vollständig (ca. 90%) wieder ausgeschieden (C).

Zur Detektion der PAH im Blutplasma und Urin muss diese markiert werden. Als Tracer dienen zum einen Farbmaler wie DACA (4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde) zur photometrischen Bestimmung der PAH-Konzentration im ELISA-Reader (Agarwal, 2002). Des Weiteren können auch Radioisotope wie ^{131}I -Hippuran als auch ^{123}I -Hippuran und MAG3 (Israelit et al., 1973; Perrone et al., 1990) verwendet und szintigrafisch nachgewiesen werden. Eine weitere Methode zur Detektion der Marker-Substanzen stellt die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie dar, im Englischen „high-liquid performance chromatography“ genannt (HPLC) (Laroutea et al., 1999), mit der Substanzen nicht nur getrennt, sondern auch identifiziert und quantifiziert werden können.

Da diese Verfahren recht aufwendig sind, werden sie vor allem für wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt. Im klinischen Bereich hat sich bisher die dynamische Nierenszintigrafie mit MAG-3 (Mercaptoacetylglycylglycylglycin) etabliert (Taylor et al., 1987; Fritzberg et al., 1986). Eine präzise Aussage über den ERPF kann bisher allerdings mit MAG3 nicht gemacht werden, da hierfür zu wenige vergleichende Untersuchungen mit PAH vorliegen. Des Weiteren bedeutet der Einsatz von Radioisotopen auch immer eine Strahlenbelastung für den Körper.

In den Versuchsreihen zur PAH-Messung wurde die photometrische Detektion der PAH im Blutplasma gewählt, um schnell und kostengünstig hinreichend genaue Aussagen zur PAH-Ausscheidung treffen zu können. Die PAH- und FITC-Inulin-

Injektionen wurden zuerst einzeln und dann im selben Versuchsaufbau durchgeführt, um die gleichzeitige Messbarkeit der PAH- und FITC-Inulin-Clearance nachzuweisen. Eine Formel zur Berechnung des ERPF anhand der PAH-Clearance im Mausblut analog zur FITC-Inulin-Clearance ist bisher noch nicht bekannt und stellt eine Fragestellung für weiterführende Forschungsprojekte dar.

2.3 Bisherige Methoden und Probleme der Clearance-Bestimmung am Mausmodell

Die wiederholte Bestimmung der GFR zur Abschätzung der Nierenfunktion und als deren Verlaufsparemeter ist derzeit an kleinen Nagern wie der Maus nur unzureichend möglich. Die Vielzahl von Neuentwicklungen an Marker-Substanzen zeigt die Unzufriedenheit mit den Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten der bisherigen Marker-Substanzen und folglich einen Optimierungsbedarf.

Bisher unterscheidet man in der Clearance-Bestimmung kontinuierliche Zufuhrmethoden der Funktionsmarker, wie mikroosmotische Pumpen, von der Single-Shot-Methode (Qi et al., 2004; Fleck et al., 1999; Rieg, 2013). Die kontinuierlichen Methoden benötigen zur Zufuhr der Marker-Substanz einen Venenverweilkatheter über den gesamten Versuchszeitraum. Des Weiteren muss eine dauerhafte Urinsammlung über einen Blasenkatheeter oder im Stoffwechselkäfig erfolgen. Das macht die kontinuierliche Zufuhrmethode zu einer invasiven, teuren und aufwendigen Methode. Auch bergen gerade die Sammelmethode des Urins große Fehlerquellen, beispielsweise durch Verschluss des Blasenkatheeters mit Urinkristallen oder durch Urinverlust im Stoffwechselkäfig. Die Single-Shot-Methode ist demgegenüber deutlich einfacher durchzuführen, da die Marker-Substanz nur einmal injiziert wird und nicht zwingend Urinproben benötigt werden. Mittlerweile wurde gezeigt, dass die Single-Shot-Methode zur GFR-Bestimmung bei exakter Durchführung des Versuchsablaufs und unter Verwendung der dazugehörigen mathematischen Gleichung des Zwei-Kompartimenten Modells (siehe 3.2.4) als gleichwertig zu den kontinuierlichen Zufuhrmethoden anzusehen ist. Sie wird sogar für wiederholte GFR-Messungen bevorzugt verwendet (Qi et al., 2004; Sturgeon et al., 1998; Rieg, 2013).

Neben der Zufuhrmethode stellen Menge und Ort der Blutentnahme eine Problematik dar. Mit einem geringen Blutvolumen von etwa 1,5 ml (7-8% des Körpergewichts) ist eine Blutentnahme bei der Maus nach den aktuellen Richtlinien der Versuchstierkunde auf 1% seines Blutvolumens pro Tag begrenzt bzw. einem einmaligen maximalen Entzug von 10% mit nachfolgender Erholungsphase. Die Limitierung der Blutentnahmemengen wiederum schränkt die Messbarkeit des Markers in den Proben stark ein. Bisherige Messungen benötigten Blutentnahmen von 20 µl (Qi et al., 2004) bis zu 300 µl (Sturgeon et al., 1998) pro Messzeitpunkt.

Mögliche Blutentnahmestellen bei der Maus stellen neben den größeren Gefäßen wie der Vena cava oder der Vena jugularis, die eine Blutentnahme unter Narkose voraussetzen, auch die Schwanzvene und der retrobulbäre Venenplexus dar. Ihre Punktion ermöglicht prinzipiell eine Blutentnahme ohne bzw. mit einer leichten Anästhesie unterhalb der für eine Operation vorausgesetzten Reflexfreiheit, allerdings nur von kleinsten Blutmengen im µl-Bereich. Deshalb wurde in der vorliegenden Dissertation die Menge des entnommenen Blutes pro Messzeitpunkt soweit wie möglich minimiert.

Die Beschreibung von FITC-markiertem Inulin mit seiner einfachen fluorometrischen Bestimmbarkeit zur GFR-Messung, gerade unter Verwendung von Proben im µl-Volumina Bereich, weckte unser Interesse in der vorliegenden Dissertation. Des Weiteren wurde untersucht, ob die photometrische Bestimmung von PAH im Blut, auch diese im µl-Volumina-Bereich, kombiniert mit der FITC-Inulin-Bestimmung durchführbar ist.

2.4 Fragestellung

Die Methoden und Untersuchungen dieses Forschungsprojektes sollten zur verbesserten Aufklärung der Nierenfunktionsmessung unter Verwendung des Tiermodells der Maus beitragen. Ziel dieser Dissertation war die Etablierung der verwendeten Methoden zur GFR-Messung und der PAH-Bestimmung in der Single-Shot-Technik, einzeln und in Kombination, an gesunden Mäusen sowie an niereninsuffizienten, 5/6-nephrektomierten Mäusen.

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes sollten folgende Fragen geklärt werden:

- 1. Lässt sich mit Hilfe der verwendeten FITC-Inulin-Methode die GFR im Mausmodell bestimmen?**
- 2. Lässt sich die Ausscheidungskinetik der PAH mit der verwendeten Methode photometrisch bestimmen?**
- 3. Beeinflussen die beiden Methoden sich untereinander, wenn sie nacheinander oder gemeinsam durchgeführt werden?**
- 4. Können beide Methoden kombiniert wiederholt an ein und demselben Tier durchgeführt werden?**

Anschließend sollte die Entwicklung der GFR und der PAH-Elimination nach Induktion der 5/6-Nx an männlichen 129/Sv-Mäusen unter folgender Fragestellung charakterisiert werden:

- 5. Sind beide Methoden weiterhin nach setzten des Nierenschadens durchführbar?**
- 6. Ist der durch die 5/6-Nx induzierte Nierenschaden mit Hilfe der GFR nachweisbar?**
- 7. Lässt sich die Entwicklung der Nierenfunktion nach 5/6-Nx auf längere Zeit mittels GFR-Bestimmung beobachten?**

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Aqua dest.	Braun, Melsungen
Braunol	Braun, Melsungen
4-Dimethyl-aminocinnam-aldehyd 1% (DACA)	Sigma Aldrich, München
5% Glucose Lösung	Braun, Melsungen
Ethanol, vergällt	Sigma Aldrich, München
FITC-markiertes Inulin	Sigma Aldrich, München
Hepes Puffer 500 mM pH 7,4	Roth, Karlsruhe / Deutschland
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
4-para-Aminohippursäure (PAH), (p-Aminohippursäure $\geq 99\%$ für biochemische Zwecke)	Merck, Darmstadt
Rompun®	Bayer, Leverkusen
Temgesic®	Essex Pharma, München
Trichloressigsäure 15% (TCA)	Sigma Aldrich, München
Ursotamin®	Serumwerk, Dresden

3.1.2 Puffer und Lösungen

DACA 1%

DACA Pulver in Ethanol lösen.
Aufbewahrung lichtgeschützt im
Kühlschrank.

FITC-Inulin 5%

FITC-Inulin in 0,9% NaCl unter
Erhitzen lösen und für 24 h bei
Raumtemperatur in 1 l 0,9%
NaCl dialysieren, steril filtrieren
und lichtgeschützt
aufbewahren.

HEPES Puffer

500 mM HEPES Pulver in Aqua
dest. lösen pH 7,4 einstellen,
steril filtrieren und im
Kühlschrank aufbewahren.

PAH-Lösung

10 mg/ml PAH in 0,9% NaCl
lösen. Gefroren unbegrenzt
haltbar

TCA 15%

TCA Pulver in Aqua dest. lösen.
Bei Raumtemperatur
aufbewahren

3.1.3 Materialien

Bepanthen Salbe	Bayer, Leverkusen
CD LABS Small Animal Retraction System	Fine science tools, Heidelberg
Dialysemembran Spectra / Por 6 (1000 Daltons, 18 mm, 0,003 inches)	Roth, Karlsruhe
Einmalrasierer Med Comfort ®	AMPri GmbH, Stelle
Einmalskalpelle Aesculap Division	Aesculap AG, Tuttlingen
Einmalspritzen 1 ml Dispomed®	Dispomed Witto HG, Gelnhausen
96 well ELISA Microplates, flacher Boden, schwarz und weiss	bio-one, Microlon®, Frickenhausen
Fibrinschwamm	Sanofi Aventis, Frankfurt
Fixationstape	Einzelhandel
Futter (Standarddiät für Ratten und Mäuse)	Altromin, Ostwestfalen / Lippe
Hautdesinfektionsspray Softasept®	Braun, Melsungen
Injektionskanüle 27 G Unolok®	HMD Healthcare Ltd., Hereford / UK
Kapillarhalter	Brand, Wertheim
Minicaps "end to end" Einmalkapillarpipetten Na-heparinisiert 10 µl	Hirschmann Laborgeräte GmbH & CoKG, Eberstadt
Molinea® plus L Unterlage	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Rotilabo Spritzenfilter (steril, 0,22 µm, PVDF)	Roth, Karlsruhe
Venofix® Safety-Venenpunktionsbesteck	Braun, Melsungen
Wärmekissen	Einzelhandel

3.1.3.1 Fäden

4-0 Perma-Handseide Ligaturfaden, schwarz geflochten nicht resorbierbar	Ethicon; Johnson + Johnson; Intl. Neuss
9-0 Ethicon Faden Ethilon Polyamid, Nadelkombination mit 1,9 cm Nadel, rund	Ethicon; Johnson + Johnson; Intl. Neuss
4-0 resorbierbarer Faden Ethicon Vicryl, Polyglactin Nadelkombination mit 7,0 cm Nadel, rund	Ethicon; Johnson + Johnson; Intl. Neuss
4-0 nicht resorbierbarer Faden Ethicon Mersilene, Nadelkombination mit 4,5 cm Nadel, rund	Ethicon; Johnson + Johnson; Intl. Neuss

3.1.3.2 Operationsbesteck

Klemme Hartman Hemostat gerade	Fine science tools, Heidelberg
Pinzette Adson Forceps	Fine science tools, Heidelberg
Pinzette Adson Forceps ½ Teeth	Fine science tools, Heidelberg
Pinzette Moria Iris Forceps 0,6 mm Tip	Fine science tools, Heidelberg
Pinzette Iris Forceps 0,6 mm Tip	Fine science tools, Heidelberg
Pinzette Delicate Forceps 0,4 mm Tip Angled	Fine science tools, Heidelberg
Pinzette Monica Ultra Fine Tipped Forceps	Fine science tools, Heidelberg
Schere Vannas Spring Scissors 2,5 mm Blades, abgewinkelt , spitz / rund	Fine science tools, Heidelberg
Schere Fine Thin Iris Scissors, 10,5 cm, spitz	Fine science tools, Heidelberg
Schere Mayo Scissors Tough Cut, stumpf	Fine science tools, Heidelberg

Nadelhalter Mayo Hegar Needle Holder	Fine science tools, Heidelberg
Nadelhalter Castroviejo Micro Needle Holder	Fine science tools, Heidelberg

3.1.4 Geräte

Binokular Nikon SM Z 800	Ehlert & Partner GbR, Niederkassel-Rheidt
Elisareader Tecan Sunrise Genios	Tecan Group Ltd, Männedorf / Schweiz
Elisareader Tecan Sunrise Hydro Flex	Tecan Group Ltd, Männedorf / Schweiz
Feinwaage Kern ABJ	Kern und Sohn, Bahlingen- Frommern
pH Meter HI 221 - Calibration check Microprocessor	HANNA instruments, Kehl am Rhein
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen

3.2 Methoden

3.2.1 Biometrische Planung / Versuchsaufbau

Zur Etablierung der Messtechniken und deren Wiederholbarkeit waren 20 nierengesunde männliche 129/Sv-Mäuse notwendig. Die Tiere wurden in zwei Gruppen (Gruppe A und B) zu je 10 Tieren eingeteilt und über einen Zeitraum von 8 Wochen verglichen. Danach wurden zur Betrachtung der funktionsgestörten Niere 10 weitere männliche 129/Sv-Mäuse (Gruppe C) 5/6 nephrektomiert und über einen Zeitraum von 9 Wochen verglichen. Insgesamt wurden für dieses Projekt 30 129/Sv-Mäuse benötigt.

3.2.1.1 Studiendesign der Etablierung der wiederholten GFR bzw. PAH Messung für die nierengesunden Mäuse

Es wurden zwei zufallsverteilte Gruppen, A und B, mit jeweils $n = 10$ Versuchstieren an drei Messterminen (Woche 0, Woche 4 und Woche 8) untersucht. Zu den ersten beiden Terminen wurden Einzelmessungen von GFR oder PAH vorgenommen, zum letzten Termin wurden beide Parameter gemeinsam bestimmt. Bei Gruppe A wurde mit der GFR-Messung und bei Gruppe B mit der PAH-Messung begonnen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Studiendesign der nierengesunden Mäuse. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Versuchstiere und die Abfolge der Messungen.

	n	Woche 0	Woche 4	Woche 8
Gruppe A	10	GFR	PAH	GFR + PAH
Gruppe B	10	PAH	GFR	GFR + PAH

Tabelle 3: Zeittafel der Untersuchungen an den nierengesunden Versuchstieren.

Woche 0	Injektion von Inulin-FITC (GFR-Messung) bzw. PAH, sowie anschließende Blutentnahmen (10 µl pro Messzeitpunkt).
Woche 4	Injektion von Inulin-FITC (GFR-Messung) bzw. PAH, sowie anschließende Blutentnahmen (10 µl pro Messzeitpunkt).
Woche 8	Injektion von Inulin-FITC (GFR-Messung) und PAH, sowie anschließende Blutentnahmen (20 µl pro Messzeitpunkt).

Dem Tierschutzantrag folgend durften maximal 30 µl Blut in Woche 0 und Woche 4 und 40 µl Blut in Woche 8 pro Entnahmezeitpunkt (siehe 3.2.2.4) entnommen werden. Bereits im Zuge der Vorversuche des Etablierungsverfahrens wurde die nachfolgende Analytik auf 10 µl benötigte Blutmenge pro Messzeitpunkt und Verfahren verringert.

3.2.1.2 Studiendesign der Etablierung der wiederholten GFR- bzw. PAH-Messung der 5/6-nephrektomierten Mäuse

Auch Gruppe C bestand aus n = 10 Tieren. An jedem Messtermin wurden Doppelmessungen von GFR und PAH vorgenommen. Die Messungen erfolgten 2 Wochen vor der 5/6-Nephrektomie, sowie 1 Woche, 5 Wochen und 9 Wochen danach.

Tabelle 4: Studiendesign der 5/6-nephrektomierten Mäuse. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Versuchstiere und die Abfolge der Messungen.

Woche	n	-2	0	1	5	9
Gruppe C	10	GFR + PAH	5/6-Nx	GFR + PAH	GFR + PAH	GFR + PAH

Tabelle 5: Zeittafel der Untersuchungen an den 5/6-nephrektomierten Versuchstieren.

Woche -2	Injektion von Inulin-FITC (GFR-Messung) und PAH sowie anschließende Blutentnahmen (20 µl pro Messzeitpunkt).
Woche 0	Induktion der 5/6-Nx.
Woche 1, 5, 9	Injektion von Inulin-FITC (GFR-Messung) und PAH sowie anschließende Blutentnahmen (20 µl pro Messzeitpunkt).

3.2.2 Tiere

3.2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die zur Etablierung der Methodik verwendeten Versuchstiere waren 10 Wochen alte männliche 129/Sv-Mäuse vom Züchter Charles River, Sulzfeld.

3.2.2.2 Narkose

Alle operativen Eingriffe, d.h. die Blutentnahmen (siehe 3.2.2.4) und die 5/6-Nx (siehe 3.2.2.5), wurden unter Narkose durchgeführt. Es wurde eine intraperitoneale Narkose (i. p.) mit Ursotamin und Rompun (2:1), im Verhältnis 1:10 in NaCl 0,9% verdünnt, verwendet.

Die Einleitung der Narkose erfolgte nach der Formel:

$$\frac{0,3 \text{ ml Narkotikum} * \text{Gewicht der Maus in g}}{20g}$$

Im Gegensatz zur 5/6-Nx muss für die Blutentnahmen keine reflexfreie Narkosetiefe erreicht werden. Die Reflexfreiheit wurde mit Hilfe des Fehlens des Zwischenzehenreflexes festgestellt.

3.2.2.3 Injektionsmethode

Die Injektion des FITC-Inulins und der PAH erfolgte intravenös in die Schwanzvene der narkotisierten Maus. Zur Vasodilatation wurde der Mausschwanz vor der Injektion etwa eine Minute lang in warmes Wasser gehalten. Die Injektion erfolgte mit einer leicht gebogenen 27 G Injektionskanüle in einem flachen Winkel in Richtung Schwanzwurzel. Die Injektionswunde wurde anschließend einige Sekunden manuell komprimiert, um Nachblutungen zu vermindern. Der Injektionszeitpunkt stellt den Zeitpunkt $t = 0$ min für die darauffolgenden Blutentnahmen dar.

3.2.2.4 Blutentnahmen

Die Blutproben wurden aus der Schwanzarterie entnommen. Nach der Narkoseeinleitung wurde der Maus zuerst ein Blutnullwert abgenommen. Auf die Injektion des FITC-Inulins bzw. des PAH folgten die Blutentnahmen in den Zeitabständen 3 min, 7 min, 10 min, 15 min, 35 min, 55 min und 75 min aus derselben Entnahmestelle. Nach jeder Blutentnahme wurde die Entnahmestelle komprimiert. Für eine erneute Blutentnahme wurde der entstandene Blutkoagel vorsichtig entfernt und die Arterie vom Schwanzschaft zur Spitze hin mehrmals abgefahren. Das Blut wurde mit einer an einem Kapillarhalter eingespannten, heparinisierten Kapillare, die 10 μ l fasst, aufgesogen und auf einer Seite mit Wachs verschlossen. Die gewonnenen Blutproben wurden in den Kapillaren in Eppendorf-Gefäßen für 8 min mit 14000 RPM zentrifugiert und bis zur Messung eingefroren. Für die Messungen wurden pro Methodik 2 μ l Blutplasma (siehe 3.2.2.4.1) pro Messzeitpunkt benötigt.

3.2.2.4.1 Plasmagewinnung

Die in den Kapillaren zentrifugierten eingefrorenen Blutproben wurden an der Erythrozyten-Plasma-Grenze in zwei Teile gebrochen. Die Plasma-enthaltende Kapillarahälfte wurde von der Bruchseite aus in ein Eppendorf-Gefäß mit einer 27 G Nadel und einer 1 ml Einmalspritze ausgeblasen. Beim Ausblasen wurde das Kapillarbruchstück mit einem Kapillarhalter festgehalten. Bis zum Zeitpunkt des Brechens wurde eine ständige Kühlung der Proben gewährleistet. Das ausgeblasene Probenmaterial wurde kurz abzentrifugiert.

3.2.2.5 5/6-Nephrektomie (5/6-Nx)

Bei Erreichen der schutzreflexfreien Narkosetiefe wurde das Abdomen mit einer medianen Laparotomie eröffnet. Das Operationsfeld wurde im Vorhinein rasiert und desinfiziert. Die Haut wurde mit einer chirurgischen Hautschere von umbilikal bis zum Sternum mit einem Schnitt, die Muskel- und Peritoneal Schicht mit einem weiteren Schnitt durchtrennt. Das Magen-Darm-Paket wurde auf ein befeuchtetes Gase Tuch verlagert. Die retroperitoneal gelegenen Nieren wurden dargestellt. Vorzugsweise wurde zuerst die linke Niere präpariert, weil sie sich durch ihre Lage im Abdomen besser zur chirurgischen Intervention eignet als die von der Leber bedeckte rechte Niere. Das perirenale Fettgewebe wurde so weit entfernt, dass die Niere frei mobilisierbar war. Dann wurde der untere Abgang der linken Nierenarterie im Nierenhilus dargestellt und mit einer Durchstichligatur mit nicht resorbierbarem 9.0 Ethicon-Faden unterbunden. Hierbei bildete sich eine sichtbare Ischämie des Gewebes aus, die sich als sofort auftretende Erblässung des unteren Nierendrittels zeigte. Verfärbte sich dieser Nierenabschnitt dunkelrot, wurden die Nierenarterie und ihre abführende Vene ligiert (siehe Abbildung 4). Sowohl die Ligatur des unteren Abgangs der Nierenarterie alleine, als auch der zusätzliche Verschluss ihrer abfließenden Nierenvene, führt zum Funktionsverlust des unteren Nierendrittels. Je nach Versorgungsgebiet des Abgangs der Nierenarterie kann der entstandene Nierenschaden in der Größe variieren. Auf der Grundlage dieses Funktionsverlustes wurde anschließend der noch zu entfernende Anteil am oberen Pol der Niere bestimmt und mittels Elektrokoagulator verödet, so dass noch ein gesundes Drittel der linken Niere als Funktionsgewebe bestehen blieb (siehe Abbildung 5). Der thermische Schaden am oberen Nierenpol wurde bei weiterbestehender leichter diffuser Blutung mit einem Fibrinschwamm versorgt. Um die rechte Niere darzustellen, wurde das Magen-Darm-Paket verlagert und die Niere wurde mobilisiert wie auf der Gegenseite. Dann wurde die rechte Nierenarterie mit ihrer darunter liegenden Vene noch vor der Aufteilung in die Abgänge der Nierenarterie frei präpariert, untertunnelt, mit einem Ligaturfaden umfahren und unterbunden. Die Niere verfärbt sich durch den entstandenen Blutstau dunkel. Nach einigen Minuten Unterbindung konnten die Nierengefäße hinter der Ligatur durchtrennt werden und die Niere wurde im Ganzen entnommen. Der Ureter wurde mit dem Elektrokoagulator durchtrennt. Das Magen-Darm-Paket wurde ins Abdomen zurückverlagert und das

Abdomen wurde mit einem zweischichtigen Wundverschluss verschlossen. Auf einer Wärmeplatte wurden die Versuchstiere bis zum Erwachen beobachtet.

Zur Analgesie wurde postoperativ Buprenex® angewandt. Eine Ampulle Buprenex® (0,324 mg/ml) wurde 1:100 in 0,9% NaCl verdünnt. Das Schmerzmittel wurde der Maus einmalig nach dem Erwachen aus der Narkose und bei Bedarf nochmals postoperativ innerhalb der ersten 24 h in einer Dosierung von 0,3 ml pro 20 g Mausgewicht subkutan injiziert.

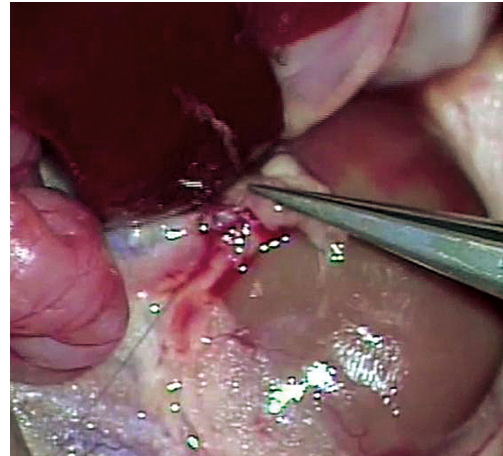
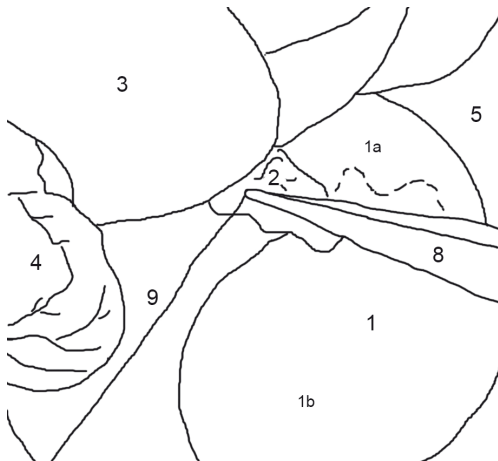
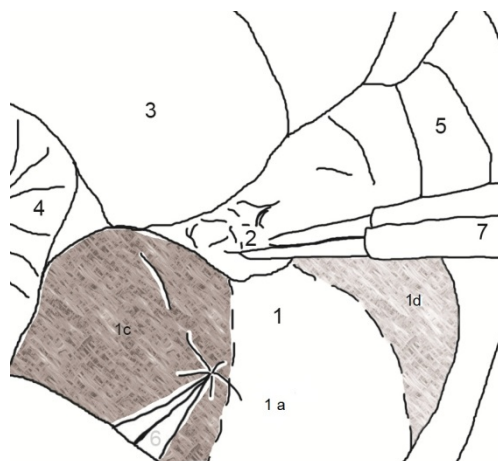
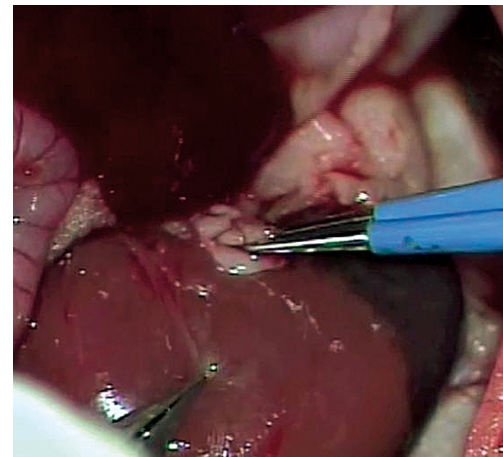
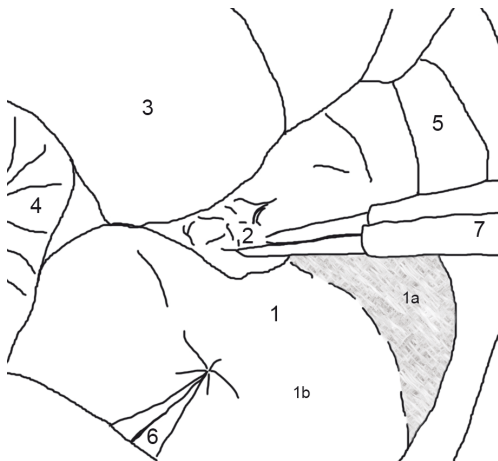


Abbildung 4: Skizze und Foto zur Ligatur des unteren Abgangs der Nierenarterie.



- 1) linke Niere
 - a) durchbluteter Nierenanteil
 - b) ischämischer Nierenpol
 - c) zu koagulierendes oberes Nierendrittel
 - d) gestauter Nierenpol
- 2) Nierenhilus
- 3) Milz
- 4) Darm
- 5) Fettgewebe
- 6) Pinzette
- 7) Elektrokoagulator
- 8) Nadelhalter
- 9) Faden

Abbildung 5: Skizzen und Foto zur Elektrokoagulation des oberen Nierenpols.

3.2.2.6 Tötung der Versuchstiere

48 h nach der letzten Messung der GFR bzw. von PAH wurden die Tiere durch CO₂ schmerzfrei getötet.

3.2.3 FITC-Inulin-Proben

3.2.3.1 Injektionsmengkalkulation

Für das FITC-Inulin wurde die schon erprobte Injektionsmengkalkulation aus der Studie von Qi et al., 2004 übernommen. Es wurden 3,74 µl des 5%-igen FITC-Inulins pro 1 g Mausgewicht injiziert. Zur Erleichterung der Injektion wurden die errechneten Injektionsmengen auf 0,5 µl genau gerundet.

3.2.3.2 Probenverarbeitung

Es wurden 2 µl des Überstands der FITC-Inulin-Proben aus 3.2.2.4.1 abpipettiert und mit 8 µl HEPES-Puffer verdünnt. Davon wurden jeweils 2 µl entnommen und als Duplikate auf eine schwarze Mikrotiterplatte mit 96 Wells und flachem Boden in der Reihenfolge Blutnullwert (blank), 3 min, 7 min, 10 min, 15 min, 35 min, 55 min, 75 min pipettiert. Jedes Well wurde zur Messung mit 98 µl HEPES-Puffer aufgefüllt. Zur Messung wurde der Elisa-Reader „Tecan Sunrise Genios“ mit den Einstellungen Fluoreszenzmessung, Exzitationswellenlänge 485 nm und Emissionswellenlänge 535 nm verwendet.

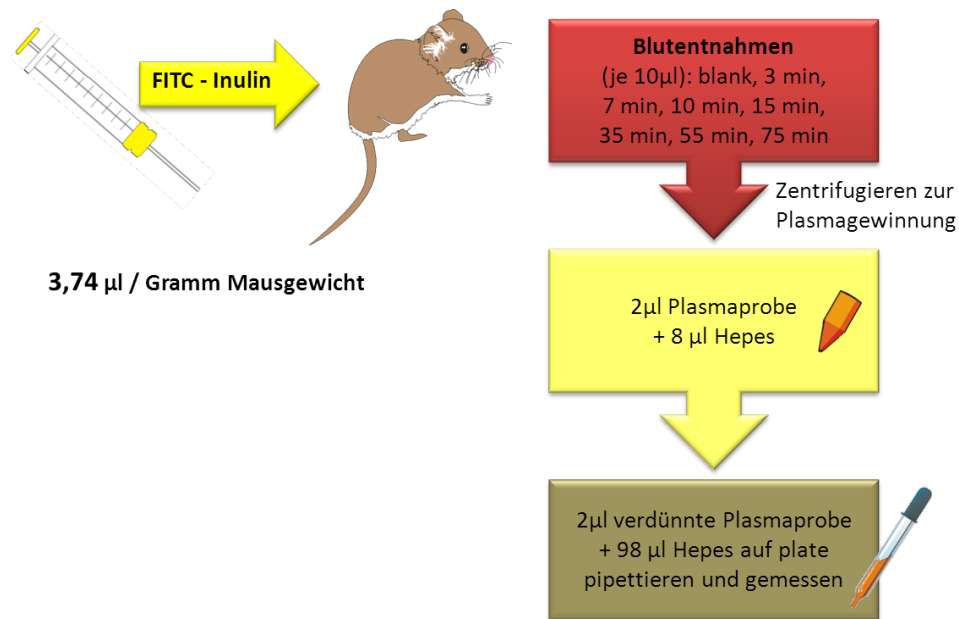


Abbildung 6: Illustration der einzelnen Schritte der Verarbeitung der FITC-Inulin-Mausproben bis zur Messung. Insgesamt wurde eine Verdünnung der Mausproben um 1:250 für die Messung vorgenommen.

3.2.4 PAH-Proben

3.2.4.1 Injektionsmengkalkulation

Für das PAH wurde die Injektionsmengkalkulation durch Messversuche mit verschieden stark konzentrierten PAH-Lösungen ermittelt. Das Löslichkeitsprodukt von PAH, welches bei Konzentrationen über 10 mg/ml überschritten wurde, die relativ hohe minimale Detektionsgrenze der ELISA und die maximale Injektionsmenge für Mäuse waren hierbei die limitierenden Faktoren. Hierauf basierend wurde die Injektionsmengkalkulation von $250 \mu\text{l} * g \text{ Maus} / 20g$ gewählt. Zur Erleichterung der Injektion wurden die errechneten Injektionsmengen auf $0,5 \mu\text{l}$ genau gerundet.

3.2.4.2 Probenverarbeitung

Es wurden $2 \mu\text{l}$ des Überstandes der PAH-Proben aus 3.2.2.4.1 abpipettiert und jeweils $108 \mu\text{l}$ TCA-Lösung zur Proteinausfällung hinzugegeben. Alle Proben wurden für acht Minuten bei 14.000 RPM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils $50 \mu\text{l}$ entnommen und als Duplikate auf eine weiße Mikrotiterplatte mit 96 Wells und flachem Boden in der Reihenfolge Blutnullwert (blank), 3 min, 7 min, 10

min, 15 min, 35 min, 55 min, 75 min besetzt. Die gefüllten Wells wurden zur Messung mit 150 µl DACA angefärbt. Zur Messung wurde der Elisa-Reader „Tecan Sunrise Hydro Flex“ im Messungsmodus Absorption mit der Messwellenlänge 550 nm verwendet.

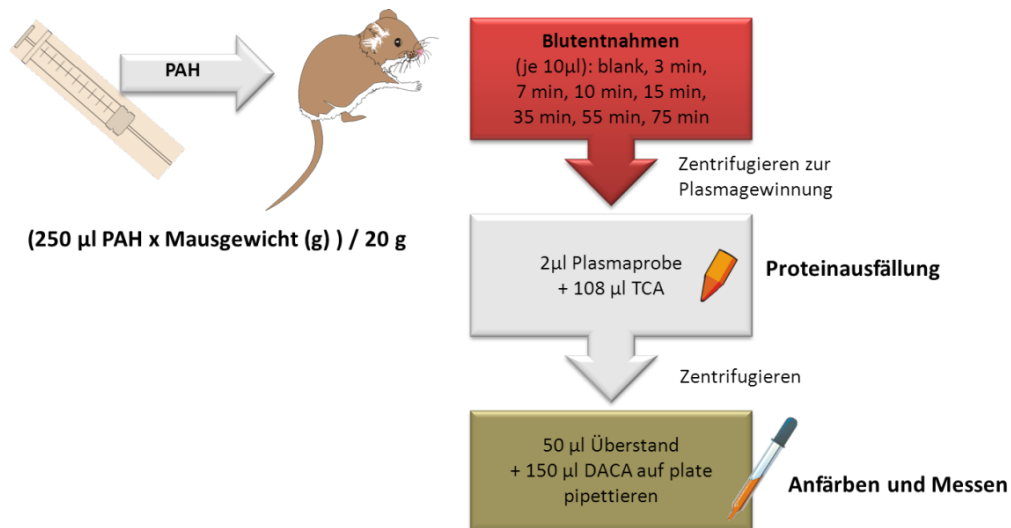


Abbildung 7: Illustration der einzelnen Schritte der Verarbeitung der PAH-Mausproben bis zur Messung.

3.2.5 Berechnung der GFR und Darstellung der PAH-Ergebnisse

3.2.5.1 Berechnung der GFR

Die Inulin-Clearance wird mit der Gleichung eines Zwei-Kompartimenten-Modells, einer gekoppelten Exponentialfunktion, beschrieben. In diesem Modell ist die Verteilung des untersuchten Stoffes deutlich schneller als seine Elimination. Das Zwei-Kompartimenten-Modell lässt sich mit folgender Formel mathematisch erfassen:

$$Y(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Plateau$$

$Y(t)$ = Fluoreszenz in FluoU zum Zeitpunkt t in min

$A = Y$ – Achsenabschnitt der Tangente an der Verteilungsphase in FluoU

$B = Y$ – Achsenabschnitt der Tangente an der Eliminationsphase in FluoU

$\alpha = 1/\tau_\alpha$ der Exponentialfunktion der Verteilungsphase in 1/min

$\beta = 1/\tau_\beta$ der Exponentialfunktion der Eliminationsphase in 1/min

τ = Zeitkonstante, hier die Halbwertszeit der jeweiligen Phase in min

$Plateau$ = Eigenfluoreszenz des Mausplasmas

A bzw. B entsprechen den Y-Achsenabschnitten der Tangente am Graphen des exponentiellen Verfalls von Verteilungs- bzw. Eliminationsphase. α bzw. β sind die Verfallskonstanten der beiden Phasen und entsprechen dem Kehrwert der Halbwertszeit τ der jeweiligen Phase (Sturgeon et al., 1998; Catlin, 1983). Um die tatsächliche Fluoreszenz zu erhalten wird die Grundfluoreszenz der Maus addiert ($Plateau$) (siehe Abbildung 8).

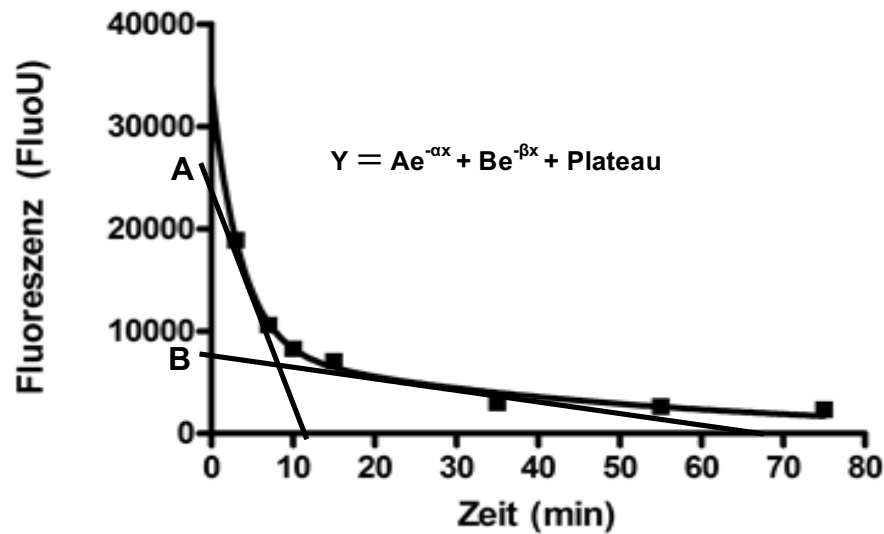


Abbildung 8: Veranschaulichung des Zwei-Kompartimenten-Modells. Die Abbildung zeigt den Zusammenhang zwischen den Verfallsfunktionen (Verteilungs- und Eliminationskurve) und den Y-Achsenabschnitten mittels Anlegen von Tangenten. A entspricht dem Y-Achsenabschnitt der Verteilungskurve und B der Eliminationskurve.

Anhand dieser Formel unter der Einbeziehung der Inulin-Dosis I lässt sich die GFR als Clearance eines Zwei-Kompartimenten-Modells berechnen (Qi et al., 2004; Sturgeon et al., 1998):

$$GFR = C_i = \frac{I}{\frac{A+B}{\alpha+\beta}}$$

C_i = Inulin Clearance = GFR

I = Inulin Dosis

A = Y – Achsenabschnitt der Tangente an der Verteilungsphase

B = Y – Achsenabschnitt der Tangente an der Eliminationsphase

α = $1/\tau$ der Exponentialfunktion der Verteilungsphase

β = $1/\tau$ der Exponentialfunktion der Eliminationsphase

τ = Zeitkonstante, hier die Halbwertszeit der jeweiligen Phase in min

Die Inulin-Dosis I entspricht dem Produkt der Fluoreszenz des injizierten FITC-Inulins im Mausblut, der injizierten Menge FITC-Inulin und des Mausgewichtes (Qi et al., 2004).

Da der Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenz nicht exakt nach der Injektion bestimmbar ist, wurde hierfür die Fluoreszenz der ersten Blutentnahme nach 3 min als Annäherung verwendet.

Die Parameter A, B, α und β im Nenner der GFR-Formel wurden mit dem Programm Sigma Plot (Systat Software GmbH, Erkrath/Deutschland) aus den Rohwerten der Fluoreszenzen der verschiedenen Messzeitpunkte ermittelt. Hierfür wurden die Einstellungen „simple straight line“, „fit curve: exponential decay“, „double 4 parameters“ verwendet.

3.2.5.2 Darstellung der PAH-Ergebnisse

Die Ausscheidungskinetik der PAH im Blut wurde als Parameter zur Beurteilung des ERPF gemessen. Es wurde graphisch die Absorption der PAH in Relation zur Zeit aufgetragen (siehe 4.3, 4.4). Momentan gibt es noch keine Formel am Mausmodell mit der man analog zur FITC-Inulin-Clearance mittels der PAH-Clearance im Blut den ERPF bestimmen kann. In den Versuchsreihen wurde vorrangig die zeitgleiche Messbarkeit von PAH und FITC-Inulin an gesunden und Nierenfunktionsgeschädigten Tieren untersucht.

3.2.6 Statistik

Die elektronische Verarbeitung der Datensätze erfolgte unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2000 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) als Balkendiagramme oder Liniendiagramm mit Mittelwerten und dem Standardfehler des Mittelwertes (Mittelwert \pm SEM).

Zur statistischen Auswertung wurden die Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) unter Verwendung von SigmaPlot 11.0 geprüft.

Eine Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurde zum Test auf zeitliche Effekte während des Untersuchungszeitraums mittels einer One-Way Analysis of Variance

(ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt. Dieser folgte der entsprechende post hoc Test (parametrische Daten: Bonferroni; nicht-parametrische Daten: Dunn's), der die Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen beinhaltet. Zum Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde ein Student's t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diesen nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test für unverbundene Stichproben (Mann Whitney-Test) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Überlebensrate der Versuchstiere und Auswertbarkeit der Ergebnisse von GFR-Messung und PAH-Bestimmung

Insgesamt bestand jede untersuchte Gruppe (A, B, C) aus $n = 10$ Versuchstieren. In den Etablierungsversuchen (Gruppe A und B) überlebten hiervon jeweils 9 Versuchstiere. Dies zeigt, dass sowohl die Injektion von FITC-Inulin, als auch die von PAH, die darauffolgenden Blutentnahmen und die i.p. Narkose von den Mäusen gut vertragen wurden, womit die Wiederholbarkeit dieser Methodik bestätigt wurde.

In den Validierungsversuchen (Gruppe C) wurden die Mäuse nach der ersten Doppelmessung von GFR und PAH 5/6-nephrektomiert. Diese chirurgische Intervention haben 7 von 10 Tieren überlebt. Im weiteren Versuchsablauf (siehe 3.2.1.2) ist eine weitere Maus vor der letzten Doppelmessung gestorben. Auch hier wurden Durchführbarkeit und Wiederholbarkeit bestätigt.

Auswertbar waren in Gruppe A die Ergebnisse von 7, in Gruppe B von 4 und in Gruppe C von 4 Versuchstieren (bzw. 3 nach dem Tod einer Maus im Versuchsverlauf).

In Tabelle 6 sind die Überlebensrate und die Auswertbarkeit der Ergebnisse der Gruppen A, B und C einander gegenübergestellt.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Überlebensrate der Versuchstiere und der Auswertbarkeit der Ergebnisse der Gruppen (A, B, C).

	A	B	C
Tiere	10	10	10
Überlebt	9	9	7
Auswertbar	7	4	4 / 3

4.2 Vergleich der GFR-Messung vor (Gruppe A) und nach (Gruppe B) PAH-Injektion

Für Gruppe A wurde die GFR-Messung am ersten (prä-PAH), für Gruppe B am zweiten Versuchstag (4 Wochen nach der PAH-Messung) vorgenommen. Für beide Gruppen war die GFR bestimmbar, unabhängig davon ob vorher eine Messung des PAH vorgenommen wurde oder nicht.

Abbildung 9 zeigt die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) der GFR-Einzelbestimmungen der Gruppen A und B mit Standardabweichungen. Die beiden Gruppen werden abhängig vom Versuchszeitpunkt der PAH-Messung benannt: Gruppe A wird als prä-PAH bezeichnet, da der GFR-Messung keine PAH-Messung vorausging. Gruppe B wird post-PAH genannt, da die GFR-Messung auf die PAH-Messung folgte. Die Mittelwerte der GFR betrugen prä-PAH $147 \mu\text{l}/\text{min} \pm 18 \mu\text{l}/\text{min}$ und post-PAH $112 \mu\text{l}/\text{min} \pm 16 \mu\text{l}/\text{min}$.

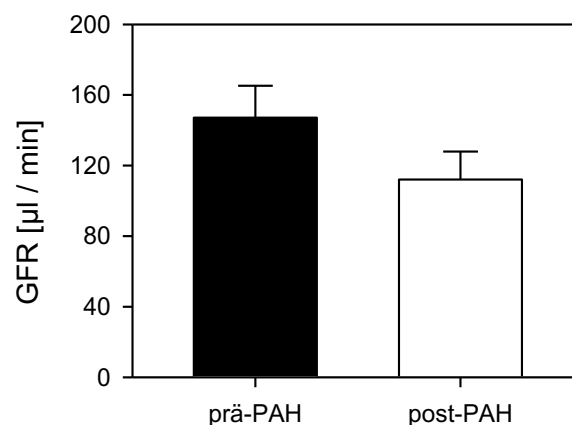


Abbildung 9: Vergleich der GFR-Messung prä-PAH (schwarz) und post-PAH (weiß) im Säulendiagramm. Mittelwert \pm SEM der GFR sind in $\mu\text{l}/\text{min}$ zu beiden Gruppen aufgetragen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen prä-PAH und post-PAH festgestellt werden. Die GFR-Messung wird demnach durch eine vorangehende PAH-Bestimmung nicht beeinflusst.

4.3 Vergleich der PAH-Bestimmung vor (Gruppe B) und nach (Gruppe A) GFR-Messung

Für Gruppe B wurde die PAH-Bestimmung am ersten (prä-GFR), für Gruppe A am zweiten Versuchstag (4 Wochen nach der GFR-Messung) vorgenommen. Auch hier war für beide Gruppen die PAH-Bestimmung durchführbar, unabhängig davon, ob vorher eine Messung der GFR vorgenommen wurde oder nicht.

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte \pm SEM der PAH-Bestimmungen der Gruppen A und B zu den einzelnen Messzeitpunkten gegenübergestellt. Gruppe A (weiß) wird als post-GFR bezeichnet, da der GFR-Messung eine PAH-Bestimmung vorausging. Gruppe B wird prä-GFR (schwarz) genannt, da noch keine GFR-Messung erfolgte.

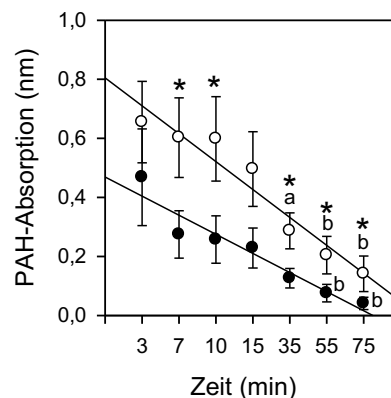


Abbildung 10: Vergleich der PAH-Bestimmung prä-GFR (schwarze Kreise) und post-GFR (weiße Kreise) im Liniendiagramm. Die PAH-Absorption (in nm) zu den einzelnen Messzeitpunkten (in min) wird von beiden Gruppen graphisch dargestellt. Mittelwert \pm SEM; *p < 0,05 vs. post-GFR; ^ap < 0,05 vs. 3,7,10min; ^bp < 0,05 vs. 3,7,10,15min.

Es ist deutlich zu sehen, dass in beiden Gruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine signifikante Reduktion der PAH-Absorption, unabhängig von der GFR-Messung, stattfindet. Eine vorangegangene GFR-Messung beeinflusst demnach die PAH-Bestimmung nicht.

4.4 Gegenüberstellung der Einzelmessungen von GFR und PAH und der Doppelmessungen (PAH+GFR)

Am dritten Versuchstag wurde in Etablierungsversuchen (Gruppe A und B) die GFR- und die PAH-Bestimmung gemeinsam als Doppelmessung durchgeführt.

In den Abbildungen 11 und 12 werden die Mittelwerte \pm SEM der Einzelmessungen von GFR bzw. PAH denen der Doppelmessungen gegenübergestellt.

In den Einzelmessungen erhielt man im Mittel eine GFR von $130 \mu\text{l}/\text{min} \pm 53 \mu\text{l}/\text{min}$. In den Doppelmessungen wurde eine GFR von $140 \mu\text{l}/\text{min} \pm 13 \mu\text{l}/\text{min}$ ermittelt.

Vergleicht man die Einzelmessungen beider Gruppen (A und B) mit den Doppelmessungen, erkennt man keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen.

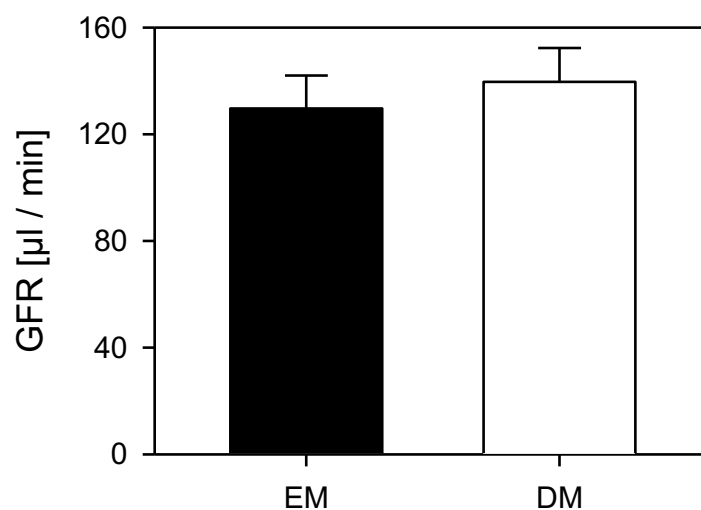


Abbildung 11: Gegenüberstellung von Mittelwert \pm SEM der GFR der Einzelmessungen (EM, schwarz) und der GFR der Doppelmessung (DM, weiß) im Säulendiagramm.

Die PAH-Werte beider Gruppen weisen einen linearen Abfall über den Messzeitraum auf. Vergleicht man die Ergebnisse der Einzelmessungen beider Gruppen (A und B) mit der der Doppelmessungen, erkennt man keinen signifikanten Unterschied in der Ausscheidungskinetik der PAH.

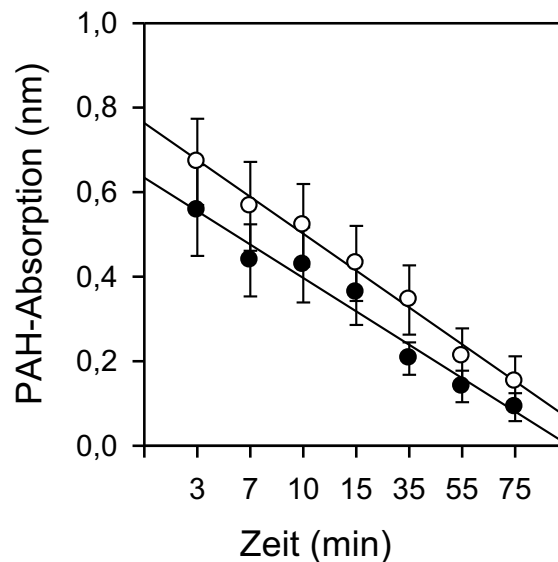


Abbildung 12: Gegenüberstellung der PAH-Ergebnisse der Einzelmessungen (EM, schwarze Kreise) und der PAH-Ergebnisse der Doppelmessung (DM, weiße Kreise). Die Mittelwerte \pm SEM der PAH-Absorption (in nm) sind zu den einzelnen Messzeitpunkten (in min) im Liniendiagramm aufgetragen; ^ap < 0,05 vs. 3min; ^bp < 0,05 vs. 3,7min; ^cp < 0,05 vs. 3,7,10,15min; ^dp < 0,05 vs. 3,7,10,15min; ^ep < 0,05 vs. 3,7,10,15,35min.

4.5 Beobachtung von GFR- und PAH-Bestimmung der 5/6-nephrektomierten Mäuse im Verlauf

Zur Validierung der untersuchten Methoden der GFR- und PAH-Bestimmung wurde das Nierenfunktionsverlustmodell der 5/6-Nephrektomie betrachtet. Die Mittelwerte der GFR und der PAH-Ergebnisse wurden an den verschiedenen Messtagen (w-2, w1, w5, w9) mit Standardfehler (SEM) gegenübergestellt. Nach den Ergebnissen von 4.4 wurden ausschließlich Doppelmessungen durchgeführt.

4.5.1 Verlauf der Nierenfunktion vor und nach 5/6-Nx anhand der GFR

Abbildung 14 zeigt den Verlauf der Nierenfunktion anhand der GFR vor und nach 5/6-Nx. Zwei Wochen vor der 5/6-Nx ließ sich in Gruppe C an der gesunden Maus eine GFR von $137 \mu\text{l}/\text{min} \pm 19 \mu\text{l}/\text{min}$ bestimmen. Eine Woche nach der Nephrektomie zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der Nierenfunktion auf $75 \mu\text{l}/\text{min} \pm 16 \mu\text{l}/\text{min}$. Dies entspricht 55% ihrer Ausgangs-GFR. Zum nächsten Messtermin (nach 5 Wochen) ließ sich wieder eine Steigerung der GFR auf $107 \mu\text{l}/\text{min} \pm 24 \mu\text{l}/\text{min}$ (78% der Ausgangs-GFR) verzeichnen. Am letzten Messtermin (9 Wochen nach 5/6-Nx) sank die GFR erneut auf $101 \mu\text{l}/\text{min} \pm 6 \mu\text{l}/\text{min}$, was 74% der Ausgangs-GFR entspricht.

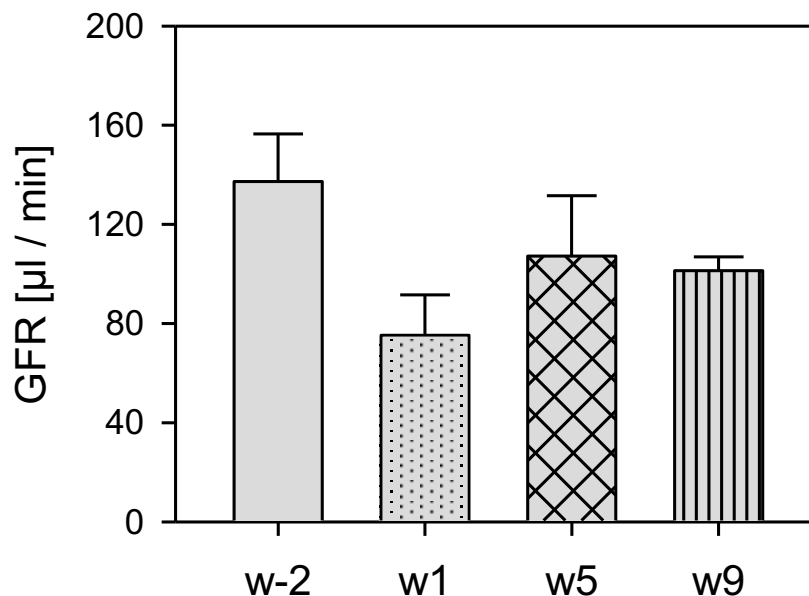


Abbildung 13: Ergebnisse der GFR-Doppelmessung zwei Wochen vor (w-2) und eine (w1), fünf (w5) und neun (w9) Wochen nach 5/6-Nx. Mittelwert \pm SEM.

Bei der niedrigen Fallgruppe lässt sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messterminen bestimmen, dennoch lässt sich eindeutig die Entwicklungstendenz der GFR nach 5/6-Nx, wie oben beschrieben, erkennen.

4.5.2 Gegenüberstellung der PAH-Ausscheidungskinetik im Verlauf vor und nach 5/6-Nx

In Abbildung 14 werden die Mittelwerte \pm SEM der PAH-Absorptionen nach a) 3 min, b) 15 min, c) 35 min und d) 75 min der verschiedenen Messtage (w-2, w1, w5, w9) gegenübergestellt.

Wegen der kleinen Fallgruppe sind wiederum keine signifikanten Aussagen bezüglich der PAH-Ausscheidung nach 5/6-Nx zu treffen. Dennoch zeigen die PAH-Absorptionen der 3. und 75. Minute tendenziell eine Entwicklung analog zur GFR-Veränderung (siehe 4.5.1). Nach 3 min wurden PAH-Absorptionen derselben Größenordnung an jedem Messtag (w-2, w1, w5, w9) gemessen. Zur 75. Minute wurde die höchste verbleibende PAH-Absorption von $0,108375 \pm 0,043839848 \text{ nm}$ und somit die höchste Konzentration von PAH im Mausblut eine Woche nach 5/6-Nx nachgewiesen. Zu den Messterminen w5 und w9 ist die gemessene PAH-Absorption zu diesem Zeitpunkt wieder geringer ($w5 = 0,036 \pm 0,026082401 \text{ nm}$, $w9 = 0,0485 \pm 0,007858117 \text{ nm}$). Bei der nierengesunden Maus (w-2) ist die PAH nach 75 min bereits fast vollständig ausgeschieden.

Die PAH-Messungen nach 15 min und 35 min zeigen mit der GFR-Entwicklung vergleichbaren Trend nach 5/6-Nx. Nach 15 min wird am Messtermin w-2 die höchste verbleibende PAH-Konzentration nachgewiesen. Zu den Terminen w1, w5 und w9 wurden hier PAH-Absorptionen derselben Größenordnung festgestellt. Nach 35 min werden in w5 und w9 die höchsten PAH-Konzentrationen nachgewiesen.

Bisher können noch keine direkten Rückschlüsse von der PAH-Absorption im Mausblut auf den ERPF gezogen werden (siehe 2.2.5). Gezeigt werden konnte jedoch, dass die PAH-Absorption auch nach 5/6-Nx ungehindert messbar und deren Entwicklung beobachtbar ist.

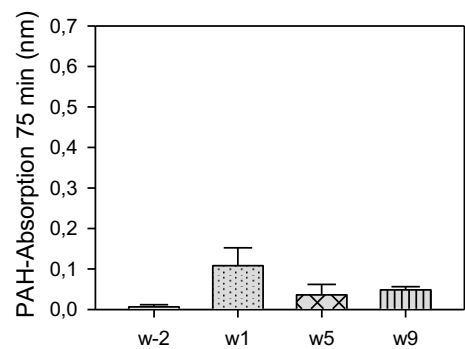
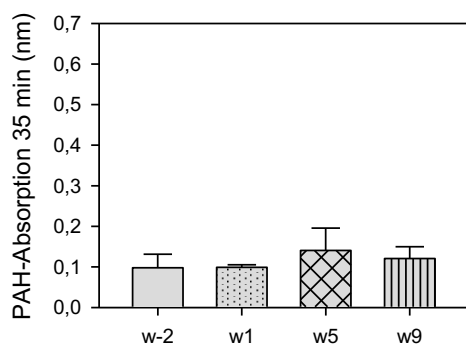
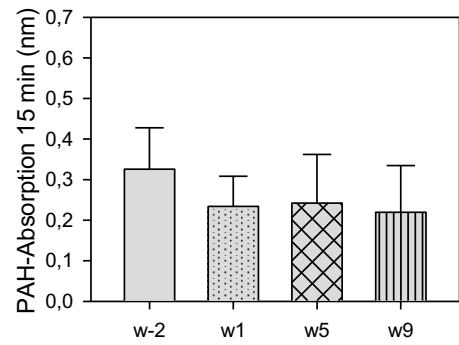
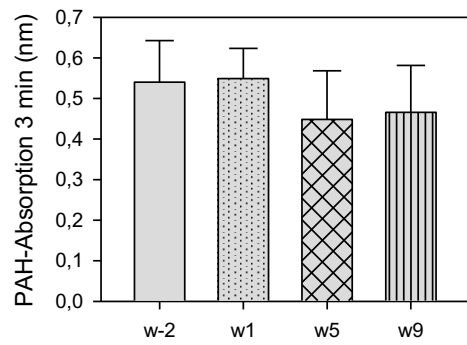


Abbildung 14: Darstellung der PAH-Ergebnisse nach a) 3 min, b) 15 min, c) 35 min und d) 75 min zu den Messterminen vor (w-2) und nach einer (w1), fünf (w5) und neun (w9) Wochen nach 5/6-Nx. Mittelwerte \pm SEM.

5 Diskussion

5.1 GFR-Ergebnisse der nierengesunden Mäuse

Mit der vorliegenden Dissertation konnte die verwendete Methodik zur GFR-Bestimmung etabliert werden. Allein mit der Messung der Ausscheidungskinetik des FITC-markierten Inulins im Blut und einer bereits etablierten Clearance-Formel zur GFR-Bestimmung $GFR = I/(A/\alpha + B/\beta)$ (siehe 3.2.5.1) wurde die GFR der nierengesunden 129/Sv-Mäuse im Bereich von $130 \pm 53 \mu\text{l}/\text{min}$ bis $140 \pm 13 \mu\text{l}/\text{min}$ bestimmt. Vergleichbare Arbeiten der Untersuchung zur FITC-Inulin-Clearance an Mäusen (Qi et al., 2004; Schock-Kusch et al., 2013; Rieg, 2013) ergaben GFR-Ergebnisse derselben Größenordnung. Qi et al. (2004) maß mittels FITC-Inulin-Clearance im Blut die GFR von männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen bei $236,69 \pm 16,55 \mu\text{l}/\text{min}$ (m) und $140,20 \pm 22,27 \mu\text{l}/\text{min}$ (w). In der Arbeit von Schock-Kusch et al. (2013) wurde mittels transkutaner FITC-Inulin-Detektion die GFR von Balb/c-Mäusen, C57BL/6-Mäusen, SV129-Mäusen und NMRI-Mäusen im Mittel im Bereich von $951 \pm 235 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ und $961 \pm 187 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ gemessen. Bei einer 20 g schweren Maus entspricht dies einer GFR von $190,2 \pm 47 \mu\text{l}/\text{min}$ bis $192,2 \pm 37,4 \mu\text{l}/\text{min}$. Auch in den Versuchen von Rieg (2013) wurde bei der nierengesunden wild-typ Maus die GFR bei ca. $240 \mu\text{l}/\text{min}$ gemessen. Es zeigt sich, dass alle Methoden repräsentative und miteinander vergleichbare GFR-Ergebnisse bei unterschiedlichem Vorgehen und unterschiedlichen Maustypen liefern.

In der vorgelegten Dissertation wurde besonderen Wert auf die Miniaturisierung der Methodik gelegt. Dies beinhaltete zum einen das Reduzieren der Blutentnahmemenge auf $10 \mu\text{l}$ pro Entnahmezeitpunkt, woraus $2 \mu\text{l}$ Plasmaprobe zur Weiterverarbeitung verwendet wurden. Vergleichbare Arbeiten wie von Qi et al. (2004) benötigten hier $80 \mu\text{l}$ Blut pro Blutentnahme, um $30 \mu\text{l}$ Plasma zur Weiterverarbeitung zu erhalten. Auch bei vorrausgehenden Arbeiten an Ratten (Sturgeon et al., 1997; De Vries et al., 1997) lagen die Blutentnahmemengen mit $300 \mu\text{l}$ pro Entnahme deutlich über den hier benötigten Mengen. Neuere Studien (Schock-Kusch et al., 2009; Rieg, 2013) zeigten deutlich die Tendenz mit einer möglichst geringen Plasmamenge, hier $1\text{-}2 \mu\text{l}$, zu arbeiten, um die erforderliche Blutentnahmemenge zu reduzieren. Dies verbessert die Verträglichkeit der Versuche

für die Maus und trägt maßgeblich zur problemlosen Wiederholbarkeit der Methodik bei.

Um die Methodik weiter zu vereinfachen wurde die FITC-Inulin-Clearance im Urin vernachlässigt. In vorangehenden Arbeiten war die Urinsammlung im Stoffwechselkäfig oder per Dauerkatheter, gemeinsam mit der Blutuntersuchung, fester Bestandteil der GFR-Bestimmung am Tiermodell (Qi et al., 2004; Takahashi et al., 2007). Dieses Vorgehen barg jedoch, neben einem großen Aufwand, immense Fehlerquellen, wie die Ungenauigkeit der Urinsammlung oder das Verstopfen des Katheters durch Urinkristalle. Studien zeigen bereits, dass auch ohne die Einbeziehung der FITC-Inulin-Clearance im Urin, gleichwertig verlässliche GFR-Ergebnisse ausschließlich anhand der FITC-Inulin-Clearance im Blut messbar sind (Fischer et al., 2000; Qi et al., 2009; Rieg, 2013). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Clearance-Bestimmung im Urin verzichtet.

Durch die Miniaturisierung der Methodik ergeben sich jedoch auch neue Fehlerquellen. Hierzu zählen die Problematik der Entnahme von minimalen Blutmengen im μl -Bereich an der Maus, sowie Pipettierfehler in der Verarbeitung von kleinen Probemengen. Dies bedarf einer genauen Handhabung und Probenverarbeitung und stellt ein generelles Problem bei Arbeiten an Mausmodellen dar (Schock-Kusch et al., 2009). Des Weiteren stellen die langen Narkosezeiten während des Versuchsablaufs wegen der Blutentnahmen einen umstrittenen Einflussfaktor für die GFR dar (Burchardi et al., 1983; Schock-Kusch et al., 2009; Winter et al., 2011), der in der Dissertation vernachlässigt und weiter zu untersuchen wäre.

Ein Ansatz zur Vermeidung dieser Problematiken stellt die transkutane FITC-Inulin-Detektion dar (Schock-Kusch et al., 2009; Schock-Kusch et al., 2011; Schreiber et al., 2012; Schock-Kusch et al., 2013), bei der die Untersuchung des Mausbluts *in vitro* wegfällt. Hierbei wurde die Fluoreszenz von FITC-Sinistrin, einem fluoreszenzmarkierten Polysaccharid ähnlich dem Inulin, über eine transkutane Sonde am Rücken des Versuchstieres gemessen. Aus dem Fluoreszenzabfall im zeitlichen Verlauf wurde die GFR analog zu unserer Methodik mittels des 2-Korpartimenten-Modells berechnet. Laut der o.g. Studien ergaben sich bei der transkutanen Fluoreszenzmessung gleichwertig genaue GFR-Ergebnisse, sowie eine bessere Verträglichkeit und Reproduzierbarkeit dieser. Dennoch bedarf diese neue Methodik

ein aufwändiges Equipment und weiterer Untersuchung, weshalb wir uns zu Beginn der Dissertation erneut der Verbesserung der Messung der FITC-Inulin-Clearance im Blut in vitro zugewandt haben.

5.2 GFR-Ergebnisse der 5/6-nephrektomierten Mäuse

In der Dissertation konnte die Verminderung der GFR nach 5/6-Nx gezeigt und die Veränderung der Nierenfunktion im Verlauf verfolgt werden. Eine Woche nach Entfernung von 5/6 des Nierenfunktionsgewebes, d.h. 83%, ließ sich ein Abfall auf 55% des Ausgangswertes der GFR verzeichnen. Bezüglich der Reduktion der GFR nach 5/6-Nx finden sich unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur. Qi et al. (2004) maßen 2 Wochen nach 5/6-Nx an C57BL/6J-Mäusen eine verbleibende GFR von 14% der Ausgangsfiltrationsleistung, was einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen Nierenfunktionsgewebe und –leistung nahelegt. Fleck et al. (1999) untersuchten die GFR an 5/6-nephrektomierten und unilateral nephrektomierten weiblichen Wistar-Ratten. Unmittelbar nach der chirurgischen Intervention wurde ebenfalls ein Abfall der GFR identisch zum Anteil des entfernten Gewebes gemessen. Jedoch wurde eine Woche nach der jeweiligen Nephrektomie in beiden Gruppen ein erneuter Anstieg der Filtrationsleistung um 80% und damit eine Wiederherstellung der GFR auf 90% bei unilateral und 29% bei 5/6-nephrektomierten Ratten verzeichnet. Dies zeigt eine Regenerationstendenz des Nierengewebes, die sich auch in den Ergebnissen dieser Dissertation widerspiegelt. 5 Wochen nach 5/6-Nx wurde in den durchgeführten Versuchsreihen bereits eine Steigerung der GFR auf 78% der ursprünglichen Filtrationsleistung bestimmt. Auch in den Versuchsreihen von Gava et al. (2012) wurde eine solche Regeneration des Nierengewebes beschrieben. Es wurde die GFR von männlichen C57BL/6-Mäusen 2 Wochen nach 5/6-Nx und einer Placebo-Gruppe nach Sham-OP (ohne chirurgischer Intervention) gegenübergestellt. Hier zeigte sich eine Verminderung der GFR nach 5/6-Nx auf 33% der GFR nach Sham-OP. Diesbezüglich wurde außerdem eine histologische Auswertung des verbleibenden Nierengewebes im Anschluss an die Versuchsreihen vorgenommen, die eine Hypertrophie der Glomeruli, sowie eine Mesangialzell-Expansion und eine gestiegene Kollagen-Ablagerung im Nierengewebe der 5/6-Nx-Mäuse zeigte. Histologisch entspricht diese Veränderung der Umstrukturierung des Nierengewebes einer CNI (Gava et al., 2012), was das Nierenschädigungsmodell der 5/6-Nx zur Untersuchung der CNI prädestiniert.

Remunzzi et al. wies bereits 1998 nach, dass die Hypertrophie der verbleibenden Glomeruli mit einem gesteigerten ERPF als kompensatorische Antwort auf die Nierenzellreduktion einhergeht, woraus eine gesteigerte glomeruläre Filtration resultierte. Dies zeigt sich auch in den Versuchen von Fleck et al. (1999) und Gava et al. (2012) sowie denen dieser Dissertation.

9 Wochen nach 5/6-Nx verschlechterte sich die GFR in den Versuchsreihen dieser Dissertation nochmals auf 74% der Ausgangs-GFR. Dieser Abfall liegt allerdings im Bereich der Standardabweichung, was einer Stagnation der GFR gleichkommt. Dennoch könnte der GFR-Abfall auch ein Zeichen der Dekompensation durch nephrotoxische Substanzen der Urämie oder einer beginnenden CNI sein. Gava et al. (2012) beschrieb hierzu analog zur gesunkenen GFR eine erhöhte Urämie und Proteinurie. Hingegen wurde bereits durch Bräunlich et al. (1986b) ein 3-monatiges Überleben von Ratten nach 5/6-Nx ohne systemische Störung mit leicht erhöhten Urämie-Werten nachgewiesen. Zur genaueren Interpretation diesbezüglich ist eine längere Beobachtung der GFR nach 5/6-Nx oder eine histologische Aufarbeitung des verbleibenden Nierengewebes ein sinnvoller Ansatz für weiterführende Versuchsreihen.

Insgesamt wurde eine derart hohe GFR nach 5/6-Nx allerdings in keiner weiteren Studie verzeichnet. Gründe hierfür könnten sowohl in der technischen Durchführung der 5/6-Nx, als auch in der Invasivität der Methode zur GFR-Messung zu finden sein. In diesen Versuchsreihen wurde nach Entfernen der rechten Niere, der untere Abgang der Arteria renalis mit einer Durchstichligatur unterbunden. Der obere Nierenpol wurde elektrokoaguliert (siehe 3.2.2.5). Bei Gava et al. (2012) wurden hier der obere und untere Abgang der Arteria renalis der linken Niere unterbunden. Qi et al. (2004) entfernte die linke Niere und den oberen und unteren rechten Nierenpol. Fleck et al. (1999) hingegen abladierte den Kortex der linken Niere zur Induktion der 5/6-Nx. Diese unterschiedlichen Vorgehensweisen können zu Differenzen in der Größenordnung des verbleibenden funktionstüchtigen Nierengewebes führen, die sich in der GFR widerspiegeln. Außerdem ist die Möglichkeit der Re-Perfusion des unterbundenen Nierengewebes durch Umgehungskreisläufe oder durch die zuführende Arterie selbst in Betracht zu ziehen.

Zuletzt ist auch die Invasivität der Methode zur GFR-Messung diesbezüglich zu betonen. Wie in 5.1 diskutiert, wurde in der vorliegenden Arbeit großen Wert auf die

Miniaturisierung der Methodik gelegt. Hieraus resultierte eine besonders gute Verträglichkeit der Versuchsreihen für die Maus, welche eine positive Auswirkung auf die Regenerationsfähigkeit der geschädigten Niere nahe legt.

5.3 Ergebnisse der PAH-Bestimmung und kombinierten Messung von GFR und PAH-Plasma-Clearance

Die gemeinsame Bestimmbarkeit von PAH und GFR an gesunden und 5/6-nephrektomierten Mäusen wurde in der vorliegenden Dissertation bestätigt. Als Vorlage für die Versuchsreihen zur PAH-Bestimmung wurde das Protokoll von Agarwal et al. (2002) herangezogen(siehe 3.2.4).

In der Literatur sind die unterschiedlichsten, jedoch zumeist schwierige, teure und zeitaufwändige, Methoden zur PAH-Bestimmung beschrieben. Bereits 1999 wurde von Laroutea et al. die gemeinsame Messbarkeit von PAH und Iohexol in männlichen Beagle-Hunden nach Single-Bolus-Injektion mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) beschrieben. Gerade die HPLC ist aber eine sehr teure und zeitaufwändige Methodik. Andere Studien verwendeten radioaktiv-markierte Substanzen zur Untersuchung des ERPF, was zusätzlich die Problematik der Radioaktivität aufbringt (Israelit et al., 1973; Perrone et al., 1990).

Agarwal et al. (2002) etablierte eine Methode zur PAH-Bestimmung, die schnell und exakt die Eliminationskinetik der PAH in Plasma und Urin mittels Absorptionsmessung ermöglichte. Hiermit wurden, ohne Verwendung von radioaktiven Substanzen, gleichwertig präzise Ergebnisse erzielt wie bei der aufwendigeren Methode der HPLC.

In den vorliegenden Versuchsreihen wurde sich auf die alleinige Detektion der PAH-Plasma-Clearance mittels Absorptionsmessung zur Vereinfachung der Methodik beschränkt. Diesem Versuchsaufbau zu Grunde liegend, gibt es, wie in 3.2.5.1 erwähnt, bisher noch keine Formel, anhand der man den ERPF ohne Urin-Clearance bestimmen kann. Ziel dieser Arbeit war es ausschließlich, die verwendete Methode zur PAH-Bestimmung analog zur GFR-Bestimmung zu miniaturisieren. Unter Verwendung minimaler Probemengen wurde die ungehinderte Messbarkeit von PAH und FITC-Inulin im selben Versuchsaufbau gezeigt. Diesbezüglich werden die

Ergebnisse der aktuellen Studie von Sallström et al. (2013) bestätigt. Sallström et al. (2013) wies sogar unter Einfluss von Candesartan eine unabhängige Entwicklung von ERPF (steigend) und GFR (gleichbleibend) nach. Selbst bei Reduktion der Blutentnahmen auf vier Referenzwerte konnten hier noch repräsentative Ergebnisse erlangt werden. Dies stellt einen Anreiz zur weiteren Simplifizierung und Miniaturisierung zukünftiger Versuchsreihen dar.

Abschließend wurde in der vorliegenden Arbeit die PAH- und GFR-Bestimmung nach 5/6-Nx durchgeführt und deren problemlose Messbarkeit nachgewiesen. Die nephrotoxischen Substanzen der Urämie nach 5/6-Nx scheinen, soweit beurteilbar, keinen Einfluss auf die Detektion der PAH-Absorption zu haben.

Die Ergebnisse dieser Dissertation stellen nun einen Ansatz für weiterführende Forschungsreihen zur alleinigen Bestimmung des ERPF aus der PAH-Plasma-Clearance und zur gemeinsamen Bestimmbarkeit von ERPF und GFR dar.

6 Literaturverzeichnis

- AGARWAL, R (2002): Agarwal, R: "A rapid microplate method for PAH estimation". In: *Am J Physiol Renal Physiol* 283(2) (2002), S. 236-41
- BRÄUNLICH, H et al (1986b): Bräunlich, H ; Stein, G ; Laske, V ; Fleck, C ; Keil, E ; Kersten, L ; Müller, A: "Renal effects of aluminium in uraemic rats and in rats with intact kidney function". In: *J Appl Toxicol* 6 (1986b), S. 55-59
- BURCHARDI, H et al. (1983): Burchardi, H ; Kaczmarczyk, G: "The effect of anaesthesia on renal function". In: *Eur J Anaesthesiol.* 11(3) (5/1994): S. 163-8
- CATLIN, DH (1983): Catlin, DH: "Pharmacokinetics". In: *Essentials of Pharmacology*, edited by Bevan, JA and Thompson, JH (1983)
- COCKROFT, DW et al. (1976): Cockcroft, DW ; GAULT, MH: "Prediction of creatinine clearance from serum creatinine". In: *Nephron* 16 (1976), S. 31-41
- CORESH, J et al. (2007): Coresh, J ; Selvin, E ; Stevens, LA ; Manzi, J ; Kusek, JW ; Eggers, P ; Van Lente, F ; Levey, AS: "Prevalence of chronic kidney disease in the United States". In: *JAMA* 298 (17) (2007), S. 2038-47
- DELAYANE, P et al. (2011): Delayane, P ; Souvignet, M ; Dubourg, L ; Thibaudin, L ; Maillard, N ; Krzesinski, JM ; Cavalier, E ; Mariat, C: "Measurement of inulin: development". In: *Ann Biol Clin (Paris)* 69(3) (2011), S.273-84
- DE VRIES, PAM et al. (1997): De Vries, PAM ; Navis, G ; De Boer, E ; De Jong, PE ; De Zeeuw, D ; Kluppel, CA: "A method for accurate measurement of GFR in conscious, spontaneously voiding rats". In: *Kidney International* 52 (1997), S. 244-247
- DWORKIN, LD (2001): Dworkin, LD: "Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate". In: *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10(5) (2001), S. 551-3
- EL NAHAS, M et al. (2005): El Nahas, M ; Bello, AK: "The global challenge of chronic kidney disease". In: *Kidney Int* 68 (6) (2005), S. 2918-29

- FISCHER, PA et al. (2000): Fischer, PA ; Bogoliuk, CB ; Ramirez, AJ ; Sánchez, RA ; Masnatta, LD: "A new procedure for evaluation of renal function without urine collection in rat". In: *Kidney Int.* 58(3) (09/2000), S. 1336-41
- FLECK, C (1999): Fleck, C: "Determination of the glomerular filtration rate (GFR): Methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions and the influence of different drugs and toxic substances". In: *Physiol Res* 48 (1999), S. 267-79
- FRITZBERG, AR et al. (1986): Fritzberg, AR ; Kasina, S; Eshima, D ; Johnson, DL: "Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG3 as a hippuran replacement". In: *J. Nucl. Med.* 27 Nr. 1 (1986), S.111–6
- GAVA, AL et al. (2012): Gava, AL ; Freitas, FPS ; Balarini, CM ; Vasquez, DC ; Meyrelles, SS: "Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice". In: *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 4(3) (2012): S. 167–173
- HIERHOLZER, K et al. (1997): Hierholzer, K ; Fromm, M: „Funktion der Nieren“. In: *Physiologie des Menschen. Hrsg.: Schmidt, RF ; Thews G, 27. Auflage. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York* (1997), S. 737-38
- HORIO, M (2006): Horrio, M: "Assessment of renal function". In: *Clinic All-round* 55(4) (2006), S. 1203-8
- ISRAELIT, AH et al. (1973): Israelit, AH ; Long, DL ; White, MG ; Hull, AR: "Measurement of glomerular filtration rate utilizing a single subcutaneous injection of 125I-iothalamate". In: *Kidney Int.* 4(5) (11/1973): S. 346-9
- KAMPMANN, JP et al. (1981): Kampmann, JP ; Hansen, JM: "Glomerular filtration rate and creatinine clearance". In: *Br J Clin Pharmacol* 12(1) (1981), S. 7-14
- KLINKE, R et al. (2003): Klink, R ; Silbernagl, S: In: „*Lehrbuch für Physiologie*“, Georg Thieme Verlag, 4. Auflage (2003), S. 295
- KNIGHT, EL et al. (2004): Knight, EL ; Verhave, JC ; Spiegelman, D ; Hillege, HL ; De Zeeuw, D ; Curhan, GC ; De Jong, PE: "Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement". In: *Kidney Int* 65 (4) (2004), S. 1416-21

- LAROUTEA, V et al. (1999): Laroutea, V ; Lefebvrea, HP ; Costesa, G ; Toutaina, PL: "Measurement of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in the conscious beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and p-aminohippuric acid". In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 41 (02/1999), S. 17–25
- LEELAHAVANICHKUL, A et al. (2010): Leelahavanichkul, A ; Yan, Q ; Hu, X ; Eisener, C ; Huang, Y ; Chen, R ; Mizel, D ; Zhou, H ; Wright, EC; Kopp, JB ; Schnermann, J ; Yuen, PST ; Star, RA: "Rapid CKD progression in a new mouse kidney remnant model: strain-dependent resistance is overcome by angiotensin II". In: *Kidney Int.* 78(11) (2010), S. 1136–1153
- LEVEY, AS et al. (1999): Levey, AS ; Bosch, JP ; Lewis, JB ; Greene, T ; Rogers, N ; Roth, D: "A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation". In: *Ann Intern Med* 130 (6) (1999), S. 461-70
- LO, LJ et al. (2009/10): Lo, LJ ; Go, AS ; Chertow, GM ; Mc Culloch, CE ; Fan, D ; Ordonez, JD ; Hsu, CY: "Dialysis requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease". In: *Kidney Int* 76(8) (2009/10), S. 893-9
- MANDAL, S et al. (1928): Mandal, S ; Jain, S ; Pokhriyal, S ; Kher, V: "Attenuating progression of chronic kidney disease (CDK)". In: *Apollo Medicine* 2(3) (2005), S. 179-86
- MÖLLER, E et al. (1928): Möller, E ; McIntosh, JF ; Van Slyke, DD: "Studies of urea excretion". In: *J Clin Invest* 6(3) (1928), S.427-65
- PERRONE, RD et al. (1990): Perrone RD, Steinman TI, Beck GJ, Skibinski CI, Royal HD, Lawlor M, Hunsicker LG: "Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of 125I-iothalamate, 169Yb-DTPA, 99mTc-DTPA, and inulin. The Modification of Diet in Renal Disease Study". In: *Am J Kidney* 16(3) (09/1990): S. 224-35
- QI, Z et al. (2004): Qi, Z ; Whitt, I ; Mehta, A ; Jianpin, J ; Zhao, M ; Harris, RC ; Fogo, AB ; Breyer, M: "Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance". In: *Am J Physiol Renal Physiol* 286 (2004), S. 590- 596

- QI, Z et al. (2009): Qi, Z ; Breyer, MD: "Measurement of glomerular filtration rate in conscious mice". In: *Methods Mol Biol.* 466 (2009): S. 61-72
- REMUZZI et al. (1998): Remuzzi, G ; Bertani, T: "Pathophysiology of Progressive Nephropathies". In: *N Engl J Med* 339 (11/12/1998): S. 1448-1456
- RIEG, T (2013): Rieg, T: "A High-throughput Method for Measurement of Glomerular Filtration Rate in Conscious Mice". In: *J Vis Exp.* (75) (2013)
- RONCO, C et al. (2009): Ronco, C ; Mc Cullough, P ; Anker, SD ; Anand, I ; Aspromonte, N ; Bagshaw, SM ; Bellomo, R ; Berl, T ; Bobek, I ; Cruz, DN ; Daliento, L ; Davenport, A ; Haapio, M ; Hillege, H ; House, AA ; Katz, N ; Maisel, A ; Mankad, S ; Zanco, P ; Mebazaa, A ; Palazzuoli, A ; Ronco, F ; Shaw, A ; Sheinfeld, G ; Soni, S ; Vescovo, G ; Zamperetti, N ; Ponikowski, P: "Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative". In: *Eur Heart J* 31 (6) (2009), S. 703-11
- RULE, AD et al. (2006): Rule, AD ; Bergstrahl, EJ ; Slezak, JM ; Bergert, J ; Larson, TS: "Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations". In: *Kidney Int* 69 (2) (2006), S. 399-405
- SÄLLSTRÖM, J et al. (2013): Sällström, J ; Fridén, M: "Simultaneous determination of renal plasma flow and glomerular filtration rate in conscious mice using dual bolus injection". In: *J Pharmacol Toxicol Methods* 67(3) (05-06/2013), S. 187-93
- SCHMIDT C (2005): Schmidt, C: "Cystatin C – a future significant marker in clinical diagnosis". In: *CLI (February/March)* (2005)
- SMITH, HW et al. (1938): Smith, HW ; Goldring, W ; Chasis, H: "The measurement of the tubula excretory mass, effective blood flow and filtration rate in the normal human kidney". In: *J. clin. Invest.* 17 (263) (1938), S. 263–78
- SCHOCK-KUSCH, D et al. (2009): Schock-Kusch, D ; Sadick, M ; Henninger, N ; Kraenzlin, B ; Claus, G ; Kloetzer, HM ; Weiss, C ; Pill, J ; Gretz, N: "Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats". In: *Nephrol Dial Transplant.*(10) (20/24/2009): S.2997-3001

- SCHOCK-KUSCH, D et al. (2011): Schock-Kusch, D ; Xie, Q ; Shulhevich, Y ; Hesser, J ; Stsepankou, D ; Sadick, M ; Koenig, S ; Hoecklin, F ; Pill, J ; Gretz, N: "Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-Sinistrin disappearance curves". In: *Kidney Int.* 79 (06/2011): S. 1254-8
- SCHOCK-KUSCH, D et al. (2013): Schock-Kusch, D ; Geraci, S ; Ermeling, E ; Shulhevich, Y ; Sticht, C ; Hesser, J ; Stsepankou, D ; Neudecker, S ; Pill, J ; Schmitt, R ; Melk, A: "Reliability of transcutaneous measurement of renal function in various strains of conscious mice". *Online publiziert am 19.08.2013: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0071519>*
- SCHREIBER, A et al. (2012): Schreiber, A ; Shulhevich, Y ; Geraci, S ; Hesser, J ; Stsepankou, D ; Neudecker, S ; Koenig, S ; Heinrich, R ; Hoecklin, F ; Pill, J ; Friedemann, J ; Schweda, F ; Gretz, N ; Schock-Kusch, D: "Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice". In: *Am J Physiol Renal Physiol.* 303(5) (09/2012): S. 783-8
- STURGEON, C et al. (1998): Sturgeon, C ; Law, ADS ; Law, WR: "Rapid determination of glomerular filtration rate by single-bolus inulin: a comparison of estimation analyses". In: *J Appl Physiol* 84 (1998), S. 2154-2162
- TAKAHASHI, N et al. (2007): Takahashi, N ; Boysen, G ; Li, F ; Li, Y ; Swenberg, JA: "Tandem mass spectrometry measurements of creatinine in mouse plasma and urine for determining glomerular filtration rate". In: *Kidney International* 71 (2007), S. 266–271
- TAYLOR, A et al. (1987): Taylor, A ; Eshima, D ; Alazraki, N: "99mTc-MAG3, a new renal imaging agent: preliminary results in patients". In: *Eur J Nucl Med.* 12 Nr.10 (1987), S. 510–14
- WEIDTMANN, B et al. (2007): Weidtmann, B ; Schunkert, H: „Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen“. In: *Internist(Berlin)* 48(8) (2007), S. 770-8
- WINTER, MD et al. (2011): Winter, MD ; Miles, KG ; Riedesel, DH: "Effect of sedation protocol on glomerular filtration rate in cats as determined by use of quantitative renal scintigraphy". In: *Am J Vet Res.* 72(9) (09/2011): S. 1222-5

7. Tabellenverzeichnis

1. Stadien der chronischen Niereninsuffizienz (CNI) der NKF
2. Studiendesign der nierengesunden Mäuse
3. Zeittafel der Untersuchungen an den nierengesunden Versuchstieren
4. Studiendesign der 5/6-nephrektomierten Mäuse
5. Zeittafel der Untersuchungen an den 5/6-nephrektomierten Versuchstieren
6. Gegenüberstellung der Überlebensrate der Versuchstiere und der Auswertbarkeit der Ergebnisse der Gruppen (A, B, C)

8. Abbildungsverzeichnis

1. Vereinfachte Darstellung des Nierenaufbaus
2. Vorgänge im Glomerulus für FITC-Inulin
3. Vorgänge im Glomerulus für PAH
4. Skizze und Foto zur Ligatur des unteren Abgangs der Nierenarterie
5. Skizzen und Foto zur Elektrokoagulation des oberen Nierenpols
6. Illustration der einzelnen Schritte der Verarbeitung der FITC-Inulin-Mausproben bis zur Messung
7. Illustration der einzelnen Schritte der Verarbeitung der PAH-Mausproben bis zur Messung
8. Veranschaulichung des Zwei-Kompartimenten-Modells
9. Vergleich der GFR-Messung prä-PAH und post-PAH im Säulendiagramm
10. Vergleich der PAH-Bestimmung prä-GFR und post-GFR im Säulendiagramm
11. Gegenüberstellung der GFR der Einzelmessungen (EM) und der GFR der Doppelmessung (DM) im Säulendiagramm
12. Gegenüberstellung der PAH-Ergebnisse der Einzelmessungen (EM) und der PAH-Ergebnisse der Doppelmessung (DM)
13. Ergebnisse der GFR-Doppelmessung zwei Wochen vor (w-2) und eine (w1), fünf (w5) und neun (w9) Wochen nach 5/6-Nx
14. Darstellung der PAH-Ergebnisse nach a) 3, b) 15, c) 35 und d) 75 min zu den Messterminen vor (w-2) und nach einer (w1), fünf (w5) und neun (w9) Wochen nach 5/6-Nx

9. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Danilo Fliser bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen, sowie Herrn Dr. Dr. Bahlmann für die Bereitstellung des Themas.

Ein besonderer Dank geht an das gesamte Labor-Team, auch arbeitsgruppenübergreifend, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, für die Mitbenutzung der Laboratorien und Geräte der Kardiologie, Orthopädie und experimentellen Chirurgie, für viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke an Martina Wagner, Dr. Tina Martin, Dr. Adam Zawada, Ellen Becker, Prof. Dr. Christine Peinelt und alle anderen.

Bei meinen Eltern und Freunden möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während des gesamten Prozesses der Dissertation, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Ein besonderer Dank gilt folgenden Personen: Zum einen meiner Freundin Anne Schäfer, die mir jederzeit mit ihrer Kreativität zur Seite stand. Zum anderen meinem Freund und Partner Alexander Flatter, der mich in Layout und Form unterstützte und mich mit fortwährender Geduld, trotz aller Turbulenzen, das Ziel vor Augen nicht verlieren ließ. Mein größter Dank gilt meiner lieben Freundin Christina Körbel, deren Forschergeist und Motivation mich maßgeblich in der Vollendung dieser Arbeit bestärkt hat.

10. Anlage I. Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Fliser und Dr. Dr. Ferdinand Bahlmann – Bereitstellung des Themas und der Materialien
2. Dr. Christina Körbel – Mitwirkung bei Auswertung und Statistik

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Trier, den 07.11.2013, Unterschrift der
Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an
Eides statt aufnehmenden Beamtin
bzw. des aufnehmenden Beamten